

**ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ  
ПЕПТИДАЗ В ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКЕ**

**Лаврентьева Е.В., Банзаракцаева Т.Г., Раднагуруева А.А., Буянтуева Л.Б.**

**Отв. редактор д.б.н., проф. Намсараев Б.Б.**

**Рецензенты**

**д.б.н Абидуева Е.Ю.**

**к.б.н. Алексеева Е.В.**

**Улан-Удэ**

**2012**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Предисловие</b>	<b>3</b>
<b>1. Прокариотная клетка</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Строение</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Особенности строения и функционирования</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1. Бактериальный геном</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2. Геном архей</b>	<b>14</b>
<b>1.2.3 Пластичность (непостоянство генома)</b>	<b>15</b>
<b>2. Пептидазы</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Классификация</b>	<b>20</b>
<b>3. Механизм экспрессии генов пептидаз</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Общие понятия</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Экспрессия генов</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Регуляция экспрессии генов</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Молекулярные механизмы экспрессии генов</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Некоторые регуляторные механизмы экспрессии генов у прокариот</b>	<b>46</b>
<b>Глоссарий</b>	<b>53</b>
<b>Литература</b>	<b>65</b>

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Интерес к изучению молекулярных механизмов экспрессии генов пептидаз в прокариотной клетке обусловлен исключительно важной ролью пептидаз в регуляции различных биологических процессов на молекулярном и клеточном уровнях. Результаты последних лет выявили множество новых аспектов в функциях пептидаз: от контроля за концентрацией индивидуальных белков до трансформации биологической активности через активацию и инактивацию физиологически активных белков и пептидов (Дунаевский и др, 2001; Степанов, 2005). Показано, что пептидазы обнаружены на всех ступенях эволюционной лестницы: в бактериях, археях, грибах вирусах и у высших эукариот. Однако, хотя все пептидазы осуществляют гидролиз белков, функциональные задачи, выполняемые различными группами ферментов, могут заметно различаться (Маликова и др, 2006; Михайлова и др. 2007; Марданова и др. 2012).

Разработки в течение последних лет геномных и постгеномных методов в России и за рубежом в значительной степени расширили возможности проведения исследований. В центре «Биоинженерия» РАН, совместно с Институтом микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, в течение последних лет успешно ведутся исследования геномов термофильных архей и бактерий. Геномные данные были использованы для идентификации путей метаболизма этих микроорганизмов, изучены молекулярные механизмы генетических процессов, эволюции геномов и отдельных генов. Также проведены структурно-функциональные исследования ферментов микроорганизмов, выделенных из термальных источников Камчатки, месторождений гидратов метана на дне озера Байкал и из подземного термального местообитания – высокотемпературного нефтяного месторождения в Западной Сибири (Бонч-Осмоловская и Равин, 2010; Марданов, Равин, 2012). Внеклеточные пептидазы, секретируемые различными микроорганизмами, характеризуются определенным набором специфических функций. Нет сомнения в том, что анализ структуры и функциональных свойств ферментов до сих пор остается чрезвычайно важным и очень продуктивным направлением исследований. Изучение пептидаз бактерий, выделенных из экстремальных мест обитания, предоставляет уникальную возможность исследовать стратегии отдельных регуляторных процессов прокариотной клетки, т.к. известно, что усиленный синтез гидролитических ферментов является одним из способов адаптации бактерий к агрессивным (экстремальным) условиям окружающей среды. Байкальский регион, где распространены экстремальные экосистемы с резко градиентными физико-химическими характеристиками, является уникальным объектом для выделения экстремофильных микроорганизмов. Исследования пептидаз экстремофильных микроорганизмов в прикладном аспекте привели к обнаружению ферментов, обладающих уникальными свойствами: экстремально термостабильных, устойчивых к экстремальным значениям pH, действию химических детергентов, органических растворителей. Особое биотехнологическое значение имеют термостабильные и щелочеустойчивые внеклеточные пептидазы.

В настоящем пособии представлены данные об основах экспрессии генов и полученные в научном обществе современные данные об основных этапах и механизмах регуляции экспрессии геномов. Основной акцент составители сделали на особенности строения и на недавно выявленные механизмы работы прокариотной клетки.

Данное учебное пособие предназначено для студентов и аспирантов высших учебных заведений, преподавателей и научных работников биологического профиля.

## 1. Прокариотная клетка

### 1.1. Строение

Прокариотная клетка — это простейший тип живой клетки. К прокариотическим (или доядерным) организмам относят бактерии и археи (рис. 1).

С внешней стороны подавляющее большинство прокариотических клеток покрыто **клеточной стенкой** - важным и обязательным структурным элементом. Клеточная стенка бактерий, специфическая по химическому составу оболочка, окружающая протопласт и тесно связанная структурно-функциональными взаимоотношениями с цитоплазматической мембраной. Толщина клеточной стенки 10 - 50 нм и составляет 10—50 % сухой массы клеток. У большинства бактерий в состав клеточной стенки входит полимер пептидогликан (муреин), который позволяет клетке сохранять форму.

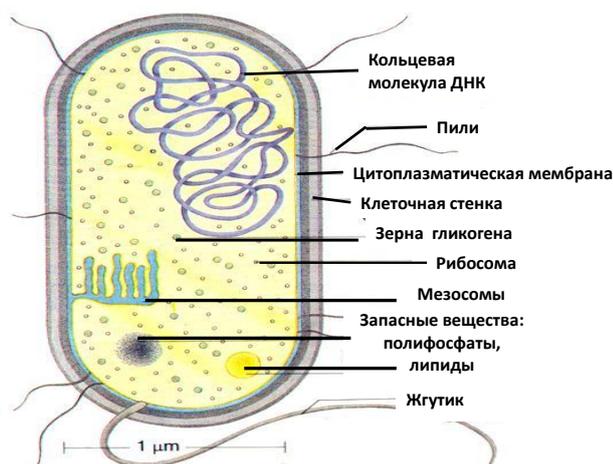


Рисунок 1. Строение прокариотных клеток

У грамположительных бактерий пептидогликан может составлять до 95%. Специфичность состава и строения пептидогликана у различных видов бактерий — важный таксономический признак. В небольшом количестве в клеточной стенке грамположительных бактерий содержатся тейхоевые и тейхуроновые кислоты, полисахариды и белки. У микобактерий в состав клеточной стенки входят липиды. Полисахариды и тейхоевые кислоты грамположительных бактерий обладают антигенными свойствами. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий кроме тонкого

(толщина 3—8 нм, 5—10% от сухой массы клеточной стенки) пептидогликанового слоя, обычно в виде однослойной сети, имеет снаружи трёхслойную липопротеидную мембрану (8 нм). Её компоненты (гликолипиды) обуславливают антигенные свойства клетки, а также их акцепторную специфичность по отношению к фагам и бактериоцинам. Пептидогликаны клеточной стенки бактерий могут быть разрушены лизоцимом или автолитическими ферментами, что приводит к образованию сферопластов и протопластов. У многих видов грамположительных (снаружи от пептидогликанового слоя) и грамотрицательных (снаружи от липопротеидной мембраны клеточной стенки) бактерий присутствуют дополнительные слои, состоящие из тетра- или гексагонально расположенных субъединиц белка (иногда гликопротеида). Стенки архей не содержат муреина и состоят из особого пептидогликана, кислого гетерополисахарида или белка. Микоплазмы полностью лишены клеточной стенки. Клеточная стенка выполняет защитную, опорную функции, придаёт клеткам определенную форму, а у грамотрицательных бактерий дополнительно к цитоплазматической мембране является барьером проницаемости.

Снаружи клеточная стенка прокариот часто бывает окружена слизистым веществом. Такие образования в зависимости от структурных особенностей получили название **капсул, слизистых слоев** или **чехлов**. Все они являются результатом биосинтеза прокариотами органических полимеров и отложения их вокруг клеток. Между этими структурами у прокариот обнаружено много переходных форм, так что иногда нельзя четко отграничивать капсулу от слизистых клеточных выделений или капсулу от чехла.

В отличие от капсул чехлы имеют тонкую структуру. Нередко в них обнаруживают несколько слоев с разным строением. Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их окислами.

Капсулы, слизистые образования и чехлы могут содержать компоненты, одинаковые с клеточной стенкой, однако их химические составы не идентичны.

Чехлы как более сложные структуры имеют обычно и более сложный химический состав. Чехол *Sphaerotilus natans*, например, содержит 36 % сахаров, 11 % гексозамина, 27 % белка, 5,2 % липида и 0,5 % фосфора.

Хотя капсулы, слизистые вещества и чехлы являются необязательными структурами прокариотной клетки, им приписывают определенные полезные для клетки функции. Они защищают клетку от механических повреждений, высыхания, создают дополнительный осмотический барьер, служат препятствием для проникновения фагов. Вязкость внеклеточной среды, обусловленная наличием слизистых веществ, очевидно,

благоприятна для клетки. Иногда слизистые образования могут служить источником запасных питательных веществ. С помощью слизи осуществляется связь между соседними клетками в колонии, а также прикрепление клеток к различным поверхностям. Способность определенных бактерий синтезировать эти своеобразные внеклеточные полимеры находит практическое применение: их используют в качестве заменителя плазмы крови, а также для получения синтетических пленок.

Некоторые виды бактерии в качестве наружного слоя клеточной стенки дополнительно имеют **гликокаликс**, который образован переплетением полисахаридных волокон (декстраны и леваны). Его не обнаруживают при выращивании на искусственных питательных средах. Основная функция гликокаликса — адгезия к различным субстратам. Например, благодаря гликокаликсу *Streptococcus mutatis* способен прочно прикрепляться к зубной эмали.

На поверхности некоторых видов бактерий имеются жгутики. **Жгутик** — спирально изогнутая полая нить, образованная субъединицами флагеллина. У разных бактерий толщина жгутиков варьирует от 12 до 18 нм, что составляет не более 1/10 диаметра жгутиков водорослей и простейших. Жгутики также различают по длине (от 1 до 20 мкм) и диаметру витка. Место прикрепления жгутика к бактериальной клетке имеет сложное строение и состоит из базальной структуры и так называемого «крюка». У грамположительных бактерий в состав базальной структуры входит одна пара, а у грамотрицательных бактерий — две пары колец. Кольца играют роль «приводного диска» и «подшипника». Вся конструкция выполняет функцию хемомеханического преобразователя (флагеллиновый мотор). У спирохет за движение ответственна особая органелла — осевая нить, состоящая из двух рядов бактериальных жгутиков, расположенных продольно внутри клетки. С помощью жгутиков клетка перемещается в жидкой среде.

Помимо жгутиков, поверхность многих бактерий покрыта цитоплазматическими выростами — **микроворсинками**. Обычно это волоски (числом от 10 до нескольких тысяч) толщиной 3-25 нм и длиной до 12 мкм. Микроворсинки встречаются как у подвижных, так и у неподвижных бактерий. Эти выросты способствуют увеличению площади поверхности бактериальной клетки, что дает ей дополнительные преимущества в утилизации питательных веществ из окружающей среды. Известны специализированные микроворсинки — **фимбрии** и **пили**.

**Фимбрии бактерий** (от лат. *fimbria*, бахрома). Многие грамотрицательные бактерии имеют длинные и тонкие микроворсинки, пронизывающие клеточную стенку. Образующие их белки формируют спиралевидную нить. Основная функция фимбрии —

прикрепление бактерий к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек), что делает их важным фактором колонизации и патогенности.

**F-пили бактерий** (от англ. fertility, плодовитость, + лат. pilus, волосок), или «секс-пили», — жёсткие цилиндрические образования, участвующие в конъюгации бактерий. Пили впервые были обнаружены у *Escherichia coli* K12, то есть у штаммов, содержащих F-фактор. Обычно клетка снабжена 1-2 пиями, имеющими вид полых белковых трубочек длиной 0,5-10 мкм; нередко они имеют шаровидное утолщение на конце. Большинство F-пилей образует специфический белок — пилин. Образование пилей кодируют плазмиды. Их идентифицируют с помощью донорспецифических бактериофагов, адсорбирующихся на пиях и лизирующих клетки.

С внутренней стороны клеточная стенка у грамположительных бактерий вплотную примыкает к **цитоплазматической мембране**, у грамотрицательных бактерий клеточная стенка отделена от цитоплазматической мембраны периплазматическим пространством. У бактерий мембрана состоит из двух слоев фосфолипидов (25-40 %) и белков. По функции мембранные белки разделяют на: а) структурные; б) пермиазы – белки транспортных систем; в) ферменты – ферменты.

Липидный состав мембран непостоянен. Он может меняться в зависимости от условий культивирования и возраста культуры. Разные виды бактерий отличаются друг от друга по липидному составу своих мембран.

У архей мембрана довольно часто бывает однослойной. В отличие от всех других организмов археи в составе мембранных липидов имеют не жирные кислоты, а многоатомные спирты, обычно с 20 или 40 атомами углерода. В последнем случае липидная пластина мембраны образована мономолекулярным слоем, что, вероятно, придает мембране особую прочность.

Цитоплазматическая мембрана обладает избирательной проницаемостью, принимает участие в транспорте питательных веществ, выведении экзотоксинов, энергетическом обмене клетки, является осмотическим барьером, участвует в регуляции роста и деления, репликации ДНК, является стабилизатором рибосом.

**Мезосомы** являются производными цитоплазматической мембраны и представляют собой впячивание плазматической мембраны в цитоплазму. Они могут быть в виде концентрических мембран, пузырьков, трубочек, в форме петли. Эти структуры выполняют у бактерий самые различные функции. Одни из этих структур — аналоги митохондрий. В мезосомах у бактерий осуществляется дыхание, у цианобактерий процесс дыхания протекает в цитоплазматических мембранах. Другие выполняют функции эндоплазматической сети или аппарата Гольджи. Путем инвагинации цитоплазматической

мембраны образуется также фотосинтезирующий аппарат бактерий. После впячивания цитоплазмы мембрана продолжает расти и образует стопки, которые по аналогии с гранулами хлоропластов растений называют стопками тилакоидов. В этих мембранах, часто заполняющих собой большую часть цитоплазмы бактериальной клетки, локализуются пигменты (бактериохлорофилл, каротиноиды) и ферменты (цитохромы), осуществляющие процесс фотосинтеза. Мезосома содержит многослойную мембранную систему, которая своей цитоплазматической стороной часто связана с ДНК. Они могут служить местом прикрепления ДНК, особенно во время репликации.

Внутриклеточное пространство прокариотических клеток заполнено **цитоплазмой**. Цитоплазма бактерий представляет собой коллоидный матрикс, служащий для реализации жизненно важных функций. Цитоплазма большинства бактерий содержит ДНК, рибосомы и запасные гранулы в виде гранул полифосфатов, гранул углеводов, жировых капель; остальное пространство занимает коллоидная фаза. Её основные составляющие — растворимые ферменты и растворимые РНК (мРНК и тРНК). Могут присутствовать включения серы (образующейся, например, в результате бескислородного фотосинтеза). У подавляющего числа бактерий цитоплазма относительно неподвижна, но у видов *Streptococcus*, *Proteus*, *Clostridium* имеются специальные трубочки — рапидосомы, аналогичные микротрубочкам простейших.

Весь генетический материал прокариотной клетки содержится в нуклеоиде. **Нуклеоид** - не ограниченный мембранами участок цитоплазмы, в котором расположен непрерывный кольцевой тяж двухцепочечной ДНК— «бактериальной хромосомы». **Хромосома** в прокариотической клетке всего одна. Молекула ДНК может достигать длины около 1 мм (например, у бактерии *E. coli*), т.е. почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки; но в клетке она обычно туго скручена в компактную спиральную структуру. Эксперименты показывают, что нуклеоид состоит в основном из ДНК (примерно 60%), а также содержит РНК и белки. Последние два компонента представляют собой в основном матричную РНК и белки, регулирующие экспрессию генов бактериального генома. В состав нуклеоида входят также структурные белки, которые способствуют компактизации ДНК, то есть несут функцию, схожую с функцией гистонов в эукариотических клетках.

В цитоплазме бактериальной клетки существуют также внехромосомные ДНК-содержащие элементы — **плазмиды**. Плазмиды представляют собой молекулы ДНК с молекулярной массой от  $1 \times 10^6$  до  $200 \times 10^6$  Да. Эти молекулы, как правило, замкнуты в кольцо и находятся в клетке в сверхспирализованной форме. Неконъюгативные плазмиды, молекулярная масса которых не превышает  $20 \times 10^6$  Да, имеют относительно простую

генетическую организацию. Конъюгативные плазмиды имеют более крупные размеры и наряду с генетической областью, контролирующей их репликацию, содержат также так называемую tra-область (англ. transfer перенос). Эта область определяет способность клетки, содержащей плазмиды, быть генетическим донором, т.е. вступать в конъюгацию с другой клеткой (реципиентом) и передавать ей свой генетический материал (плазмидную либо хромосомную ДНК). Под контролем tra-генов синтезируются поверхностные «половые» ворсинки (F-пили) клетки-донора, необходимые для ее конъюгации с клеткой-реципиентом, а также ферменты, обеспечивающие метаболизм ДНК в процессе конъюгации. Неконъюгативные плазмиды обычно не содержат tra-области и поэтому не могут самостоятельно передаваться из одной клетки в другую. Однако передача неконъюгативной плазмиды возможна за счет продуктов (белков) tra-генов конъюгативной плазмиды, находящейся вместе с неконъюгативной в одной и той же клетке. Активность плазмидных генов, ответственных за репликацию, несовместимость плазмид, конъюгативность и другие свойства бактериальных клеток, в той или иной мере находится также под контролем хромосомных систем генетической регуляции. Значительное место в составе плазмидной ДНК могут занимать различные гены, обеспечивающие бактериям-хозяевам в определенных условиях существования селективные преимущества по сравнению с бесплазмидными бактериями (например, гены, контролирующие устойчивость клеток к действию антибиотиков, солей тяжелых металлов, ионизирующего излучения, бактериоциногенность и др.). Предполагают, что в процессе эволюции бактерий такие гены могли попасть в состав плазмид в результате генетического обмена (рекомбинации) между различными молекулами ДНК бактериальных клеток. Установлена важная роль в этом процессе мигрирующих (транслоцирующихся) фрагментов ДНК (транспозонов), способных перемещаться из одной генетической структуры клетки в другую (например, из хромосомы в плазмиду, из одной плазмиды в другую плазмиду, из бактериофага в плазмиду и наоборот).

Способность плазмид быстро копироваться и передаваться из клетки в клетку при внутривидовой, межвидовой и межродовой конъюгации бактерий определяет важную роль плазмид в эволюции этих организмов. Плазмиды как автономные единицы репликации (репликоны) широко применяются в экспериментах по генетической инженерии.

В цитоплазме бактерий содержатся рибосомы. **Рибосома** - сложная органелла диаметром 200А, в которой осуществляется синтез белка. У бактерий многие рибосомы расположены в цитоплазме свободно, некоторые из них могут быть связаны с мембранами. В связи с тем, что бактерии размножаются с высокой скоростью, рибосомы

могут составлять до 40% массы клетки, их насчитывается больше тысячи. При этом они часто соединяются между собой, образуя агрегаты, называемые полирибосомами или полисомами. Рибосома — это комплекс молекул белков и РНК (рРНК), образующих почти сферическую частицу диаметром 20 нм с коэффициентом седиментации 70S. В рибосоме можно выделить две части — большую и малую субчастицы. Большая субчастица состоит из 34 разных белков, связанных с большой (23S) и малой (5S) молекулами рРНК. Малая субчастица содержит 21 белок и молекулу рРНК среднего размера (16S). Изучение 16S рРНК является основой геносистематики, позволяя оценить степень родства организмов.

## **1.2. Особенности строения и функционирования**

### **1.2.1. Бактериальный геном.**

Для хромосом бактерий в отличие от хромосом эукариот характерно относительно высокое содержание генов в расчете на имеющуюся ДНК. Нельзя не обратить внимания также и на очень высокое абсолютное число генов, видимо, необходимых для функционирования, казалось бы, такой простой биологической организации как бактерия.

Тысячу известных генов *E.coli* можно грубо разделить на следующие категории: транспорт различных соединений в клетку (~ 10%), катаболизм различных соединений — источников энергии (~20%), синтез аминокислот, нуклеотидов, витаминов, компонентов оболочки, фосфолипидов и других соединений (~30%), синтез белка (~20%), синтез и репарация ДНК (~10%), прочие (10%). Из перечисленных категорий две первые (~30%), очевидно, обеспечивают экологический потенциал вида, т.е. возможность существования бактерий данного вида в разнообразных экологических ситуациях. Возможно, гены именно такого рода, которые функционируют редко (например, из-за катаболитной репрессии в присутствии глюкозы), составляют большинство среди генов *E.coli*, остающихся неизвестными. Другими словами, возможно, что очень большое число генов у бактерий типа *E.coli* — результат естественного отбора на расширение экологического потенциала вида и соответственно прогрессивной эволюции, сопряженной с периодическими приращениями генома.

Другая особенность бактериального генома состоит в наличии оперонов — целостно транскрибируемых групп функционально родственных генов. Так, из 1027 генов на генетической карте *E.coli*, по крайней мере, 374 гена относятся к 108 оперонам или тесно сцепленным группам — предположительным оперонам. Более подробно опероны рассмотрены ниже, в главе «Регуляция экспрессии генов».

Важнейшая особенность в организации бактериального генома состоит в его разделении на два во многих отношениях симметричных полугенома. Так, у *E.coli* и *Salmonella typhimurium* область начала двунаправленной репликации – *oriC* – разделяет хромосому на два примерно равных по величине плеча, отделенных на противоположной стороне кольцевой хромосомы областью терминации репликации – *terC*. На каждом из двух плеч хромосомы *E.coli* имеются характерные скопления – области повышенной плотности генов, которые занимают симметричные места слева и справа от *oriC*, особенно в областях полугенома, расположенных ближе к *oriC*, чем к *terC*. В половине кольцевой хромосомы *E.coli*, прилегающей к *oriC*, вообще картировано больше генов (55%), чем в «дистальной» половине генома, прилегающей к *terC* (45 %).

Неравномерное распределение генов в двух примерно симметричных полугеномах было продемонстрировано в работах ряда ученых, которые предположили, что скопления генов в определенных сегментах хромосомы соответствуют структурно более доступным областям нуклеоида, т.е. они отражают укладку хромосомы в нуклеоиде. Такое объяснение косвенно подтверждается тем, что в областях скоплений генов на хромосоме *E.coli* обнаруживаются повышенные значения частоты генетической рекомбинации при трансдукции.

Некоторое сходство в организации полугеномов проявляется в расположении гомологичных повторов на хромосомах *E. coli* и *S. typhimurium*. К таким повторам относятся, прежде всего, 7 *gpn*-оперонов, содержащих идентичные гены рибосомальных РНК – *rns* (16S), *rnl* (23S) и *rnf* (5S). Опероны *gpn*, находящиеся по разные стороны *oriC*, имеют противоположное направление. Другими словами, в каждом отдельном полугеноме *gpn*-опероны расположены как прямые нуклеотидные повторы, и поэтому появляется возможность образования путем неравного кроссинговера между сестринскими хромосомами тандемных дупликаций, включающих протяженные сегменты между *gpn*-оперонами. Но если происходит рекомбинационное взаимодействие между *gpn*-оперонами из разных полугеномов (подобных инвертированным повторам), то образуются протяженные инверсии, как, например, инверсия сегмента хромосомы между оперонами *rnnD* и *rnnE* в штамме *E.coli* W3110.

Как уже было упомянуто выше, определяющей особенностью молекулярной организации прокариот является наличие прямого контакта между хромосомой клетки и цитоплазмой. Отсутствие ядра является лишь внешним проявлением особой организации генома у прокариот, которая коренным образом отличается от таковой у эукариотических организмов. В отличие от эукариот, геном прокариот построен очень компактно. Нуклеоиды бактерий представляют собой тела, состоящие из многочисленных

суперспирализованных петель ДНК, отходящих от плотной центральной области. В одну такую петлю или домен входит до 10-15 мкм ДНК, или около 40 000 н.п., а всего таких петель - около 120. При обработке выделенных нуклеоидов РНК-азой и протеолитическими ферментами происходит разрыхление центральной области нуклеоидов, а при короткой обработке ДНК-азой снимается суперспирализация петель, и декомпактизация всего нуклеоида. Таким образом было показано, что компактизация нуклеоида связана с наличием связей, содержащих РНК и некоторые белки. Тем самым гигантская кольцевая молекула - хромосома с помощью РНК и белков многократно складывается, образуя многочисленные петли, ДНК которых подвергается суперспирализации, что приводит к значительной компактизации всего комплекса, который и представляет собой нуклеоид. Степень компактизации ДНК в нуклеоиде бактерий достигает 1000 крат, а концентрация ДНК доходит до 10 мг/мл (!). Необходимо подчеркнуть, что часть ДНК нуклеоида связана с небольшим числом специальных основных белков, отличных от гистонов эукариот. Одна молекула одного из таких белков (H-NS) приходится на 400 н.п. ДНК. С петлями ДНК нуклеоида связано большое число молекул различных синтезируемых РНК и рибосом, которые обнаруживаются по периферии нуклеоида.

Одна из моделей организации нуклеоида предполагает, что центральная его часть представлена неактивной и суперспирализованной ДНК, тогда как по его периферии расположены деспирализованные петли, которые обычно интерпретируют как сегменты бактериальной хромосомы, вовлеченные в транскрипцию. Полагают, что эти участки состоят из петель ДНК бактериальной хромосомы, которые в зависимости от физиологического состояния клетки находятся в транскрипционно-активном состоянии или втягиваются внутрь нуклеоидов при подавлении транскрипции. Функционально-активный нуклеоид, видимый под электронным микроскопом как размытая структура поверхности нуклеоидов, отражает подвижное состояние активно транскрибируемых петель ДНК.

То, что ДНК нуклеоида находится в состоянии так называемой отрицательной суперскрученности, имеет важное значение для экспрессии генов. Это означает, что на уровне третичной структуры ДНК образует супервитки, причем в противоположном направлении по отношению к двойной спирали, закрученной вправо. Один супервиток образуется на каждые 200 пар оснований, а в масштабе целой хромосомы образуются отдельные домены, или петли, в которых суперскручивание происходит независимо. Во многих работах показано, что состояние суперскрученности облегчает плавление ДНК при инициации транскрипции и тем самым способствует экспрессии генов; состояние

отрицательной сверхскрученности ДНК в нуклеоиде обязано действию фермента ДНК-гиразы. В культуре клеток *E.coli*, делящихся со скоростью 30 мин, на один нуклеоид образуется около 120 доменов отрицательной сверхскрученности или  $43 \pm 10$  доменов на геном. Отсюда на домен в среднем приходится  $\sim 100$  тысяч нуклеотидных пар, что на карте *E.coli* соответствует сегменту хромосомы протяженностью  $\sim 2$  мин. Таков может быть размер гипотетической области, в которой экспрессия генов зависит от состояния сверхспирализации ДНК.

Отличительной чертой нуклеоида прокариот является одновременный синтез РНК и синтез белка: рибосомы связываются с еще не до конца синтезированными молекулами иРНК и производят на них синтез белка. То есть возникает тройственный синтетический комплекс: ДНК - синтезирующая цепь РНК - рибосомы с синтезируемой полипептидной цепочкой. Такая ситуация возможна лишь в том случае, когда образующаяся молекула иРНК не подвергается дальнейшей модификации типа процессинга, характерного для эукариотических клеток. У прокариотов, таким образом, процессы транскрипции и трансляции не разобщены территориально, в то время как у эукариотических клеток эти процессы протекают в двух разных компартментах, разделенных специальной ядерной оболочкой.

Таким образом, нуклеоид бактериальных клеток не является статическим внутриклеточным образованием или компартментом, которые можно четко определять морфологически. Напротив, во время различных фаз роста бактериальных клеток нуклеоид непрерывно меняет форму, что, по-видимому, сопряжено с транскрипционной активностью определенных бактериальных генов. Так же как и в хромосомах эукариот, ДНК нуклеоида ассоциирована со многими ДНК-связывающими белками, в частности гистоноподобными белками HU, H-NS и IHF, а также топоизомеразами, которые оказывают большое влияние на функционирование бактериальных хромосом и их внутриклеточную компактизацию. Однако детальные молекулярные механизмы конденсации бактериальной ДНК с образованием лабильных "компактосом" (по аналогии со стабильными нуклеосомами эукариот) пока неизвестны. В последнее время возрастает интерес к бактериальному так называемому LP-хроматину (low protein chromatin), для которого характерно относительно низкое содержание белкового компонента. Аналогичный LP-хроматин обнаруживают у вирусов, в митохондриях, пластидах и у динофлагеллят (жгутиконосцев). Следовательно, этот тип структурной организации генетического материала претендует на универсальность и ассоциирован с определенными формами регуляции экспрессии генов, свойственными прокариотическим организмам.

### 1.2.2. Геном архей

Царство архей представляет собой своеобразную и наименее изученную таксономическую группу прокариот. Хотя по своей морфологии *Archea* похожи на привычные эубактерии, на молекулярном уровне они сближены с эукариотами. Эти микроорганизмы часто рассматривают как прокариотические эволюционные предшественники эукариот, в связи с чем представляется целесообразным рассмотреть строение генома архей более подробно.

Архея *Methanococcus jannaschii*, первичная структура генома которой была полностью определена в 1996 г., обнаружена в горячих морских глубоководных источниках. Энергию для жизнедеятельности этот микроорганизм получает при восстановлении двуокиси углерода до метана молекулярным водородом. Температура, близкая к температуре кипящей воды, является оптимальной для его роста, который может происходить при давлении более 200 атм.. *M. jannaschii* не требует для своего роста органических соединений: все необходимое для жизни он синтезирует из неорганических веществ – CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> и т.п. Геном *M. jannaschii* состоит из основной кольцевой хромосомы и двух небольших внехромосомных элементов, размеры которых составляют соответственно 1700, 58 и 16 тысяч пар оснований. Подобные размеры геномов типичны для архей и эубактерий. Интересно, что GC-состав ДНК этого ярко выраженного термофила невысок и составляет всего 31%. Геном организован компактно: обнаружено ~1700 потенциальных кодирующих участков ДНК, по одному на каждую 1000 п.о.

Многие ДНК-локусы *M. jannaschii* не обнаруживают гомологии с уже известными последовательностями. Функциональное значение большого числа потенциальных кодирующих последовательностей генома этого микроорганизма остается невыясненным. Таким образом, *M. jannaschii* отличается от других прокариот и эукариот большим набором только ему свойственных генов и функций. Анализ структуры генома *M. jannaschii* показал, что гены, организующие системы обработки генетической информации – транскрипции, трансляции и репликации ДНК, в большей степени напоминают гены эукариот, чем бактерий. При этом гены системы трансляции оказались наиболее консервативными (обладали наибольшей гомологией) у прокариот, эукариот и архей. Из них гены рРНК – универсальны, так же как и гены некоторых рибосомных белков. Специфические рибосомные белки *M. jannaschii* имеют гомологов у эукариот, но не у эубактерий. Большинство распознанных факторов трансляции у этой археи также оказались эукариотического типа. То же, хотя и в меньшей степени, относится к аминоацил-тРНК-синтетазам.

При сравнительном анализе генов системы транскрипции оказалось, что РНК-

полимеразы *M. jannaschii* и эубактерий обнаруживают гомологию среди субъединиц, формирующих минимальный фермент, однако архея обладает малыми дополнительными субъединицами, которые не свойственны эубактериям, а их гомологи имеются у РНК-полимераз эукариот. Лишь два из основных факторов транскрипции *M. jannaschii* гомологичны таковым эукариот, а один или два фактора рассматриваются, как "рудиментарные" формы соответствующих эукариотических факторов. Таким образом, система транскрипции архей сегодня представляется как более простая и, возможно, более примитивная версия соответствующей эукариотической системы.

В геноме *M. jannaschii* найден только один ген, кодирующий ДНК-полимеразу, которая напоминает эукариотическую ДНК-полимеразу  $\epsilon$ . ДНК-полимераза Pol III, осуществляющая репликацию ДНК у эубактерий, не имеет гомолога у *M. jannaschii*. Высокую гомологию с белками эукариот обнаруживают и другие белки археи: гистоны, белки, контролирующие деление клетки, протеасомы, факторы элонгации трансляции, белки систем репарации и транспорта. Для *M. jannaschii*, как и для эубактерий, характерна организация генов в виде оперонов. Однако в первом случае опероны встречаются редко и почти всегда объединяют гены субъединиц белковых комплексов, например РНК-полимеразы, рибосом или метил-коэнзим М-редуктазы. В то же время довольно редки опероны, содержащие гены, объединенные по принципу контроля последовательных метаболических реакций. У *M. jannaschii* такие гены могут быть случайным образом распределены по геному.

Итак, несмотря на то, что археи образуют особое царство и по ряду своих генетических свойств приближаются к эукариотам, размер их генома и набор основных генов остаются типичными для свободно живущих бактерий.

### **1.2.3. Пластичность (непостоянство) геномов.**

Потенциальная возможность для изменения прокариотических и эукариотических геномов обеспечивается способностью определенных последовательностей перемещаться с одного сайта в другой. Эти последовательности получили название **транспозирующихся элементов**, или **транспозонов**. Транспозиция не основана на каком-либо родстве между последовательностями в донорных и реципиентных сайтах, и это отличает ее от всех других механизмов, участвующих в перестройках ДНК. Каждый транспозон несет гены, требуемые для его собственной транспозиции, хотя для этого необходимы также функции генома, в котором находится транспозон (в частности, ДНК-полимераза и ДНК-гираза хозяина). Бактериальные транспозиции включают дубликацию

элемента: одна копия сохраняется в исходном донорном сайте, в то время как другая появляется в новом реципиентном сайте, или сайте-мишени.

Транспозирующиеся элементы были открыты при обнаружении вставок (инсерций) нового материала в пределах бактериальных оперонов. Такие вставки локализуются внутри гена и предотвращают его транскрипцию и (или) трансляцию. Кроме того, они могут проявлять полярный эффект, выражающийся в уменьшении степени экспрессии следующих за ними генов оперона. Первоначально определенные как негативные мутации, вставки были идентифицированы благодаря тому, что в отличие от точечных мутаций единственной формой реверсий для них является делетирование встроенного материала. При сравнении последовательностей, присутствующих в различных инсерционных мутантах, оказалось возможным классифицировать несколько дискретных элементов. Каждый тип элемента мог быть встроен в любой ориентации в определенный сайт.

У прокариот выделено несколько основных групп мигрирующих генетических элементов - IS- и Tn-элементы, эписомы, а также некоторые бактериофаги, или фаги (вирусы бактерий, способные ее поражать, репродуцироваться в ней и вызывать ее гибель). IS-элементы - простые вставочные (инсерционные) последовательности (обозначаются - в зависимости от их нуклеотидного состава номерами IS1, IS2 и т. д.); содержат от 700 до 1500 пар нуклеотидов. Эти сегменты ДНК имеют инвертированные повторы на концах, содержащие обычно несколько десятков нуклеотидных пар, и не содержат никаких генов, кроме тех, которые необходимы для их перемещения (транспозиции) по геному. Они встречаются в некоторых плаزمиде и умеренных фагах (способны существовать в клетке в форме профага). Так, у разных штаммов бактерии *Escherichia coli* присутствует в геноме 19 копий IS1-элементов. Большинство других IS-элементов также представлено в хромосомах разных штаммов *E. coli* многими копиями: IS2 - от 0 до 12, IS3 - от 4 до 6, IS4 - от 1 до 2, IS5 - от 0 до 10.

Транспозиции IS-элементов не сопряжены с их исключением из мест исходной локализации в плазмиде или хромосоме; при транспозиции IS-элемент удваивается и одна его копия остается на прежнем месте, а другая попадает в новый локус (местоположение гена в хромосоме или плазмиде). Таким образом, транспозиции этого элемента сопряжены с репликацией его ДНК.

Обычно IS-элементы встраиваются в различные места бактериального генома, однако некоторые участки оказываются более предпочтительными, чем другие. Встраивание и исключение этих элементов происходит с высокой точностью, что

свидетельствует об участии в этих процессах ферментов, узнающих инвертированные концевые повторы IS-элементов.

Ферментные системы, обуславливающие транспозиции IS-элементов, по крайней мере, частично кодируются их собственными ДНК. Так, IS1, судя по длине его нуклеотидной последовательности, может кодировать лишь небольшие полипептиды, которые участвуют в его транспозиции, вероятно, в комплексе с клеточными белками.

Значение IS-элементов для эволюции бактерий связано с тем, что эти элементы при своих перемещениях инактивируют различные гены или нарушают их нормальную регуляцию. Помимо прямого влияния на экспрессию гена (развития признака, контролируемого данным геном) вследствие транспозиции инсерционной последовательности непосредственно в кодирующую часть гена или его регуляторную зону, эти мигрирующие генетические элементы могут влиять также на транскрипцию (биосинтез информационной РНК на матрице ДНК) окружающих их последовательностей ДНК генома. Это происходит вследствие того, что многие IS-элементы содержат промоторные (инициирующие транскрипцию) и терминаторные (прекращающие транскрипцию) участки ДНК. Транспозиции IS-элементов могут вызывать слияние двух не связанных ранее генов или оперонов с образованием новых функциональных единиц, а также индуцировать все виды хромосомных перестроек. Соединение разнородных репликонов (элементарная генетическая структура, способная к самокопированию) имеет большое биологическое значение, так как объединяет ранее разобщенные генетические детерминанты, подчас принадлежащие разным видам организмов.

Tn-элементы (сложные перемещающиеся элементы, или транспозоны) принципиально отличаются от IS-элементов только тем, что содержат дополнительные структурные гены, не имеющие отношения к функции транспозиции. Известно много транспозонов, в состав которых входят гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и другим ядам. При этом один и тот же транспозон иногда несет целый набор детерминант резистентности (так называемые V-детерминанты). Такие транспозоны наиболее широко распространены, так как представляют ценность для селекции бактерий. Существуют транспозоны, содержащие гены, которые кодируют токсины, а также свойственные данному организму ферменты. Как правило, Tn-элементы несут на концах целые или частично измененные IS-элементы, которые сообщают им способность перемещаться по геному и вызывать в нем те же изменения, что и свободные IS-элементы. При этом 2 концевые IS-подобные терминальные последовательности в зависимости от типа транспозона могут иметь прямую или инвертированную последовательность

нуклеотидов. Разные транспозоны часто содержат одинаковые терминальные последовательности нуклеотидов.

Транспозиция Tn-элементов осуществляется по такому же механизму, как и IS-элементов, и также включает стадию трансляции. Большинство транспозонов не выбирает для своего включения строго определенные последовательности в ДНК. Однако обычно они предпочитают некоторые районы хромосом и даже специфические участки, причем разные Tn-элементы различаются по специфичности выбора мест интеграции.

Частота и характер перемещений IS- и Tn-элементов варьируют в весьма широких пределах и зависят прежде всего от свойств самих элементов. Например, Tn3 плазмиды перемещаются чаще в другие плазмиды, чем в хромосому. На транспозиции влияют не только генетические, но и различные внешние факторы, например УФ облучение. По-видимому, яды, инактивация которых обусловлена генами транспозонов, могут индуцировать синтез ферментов, необходимых для транспозиции этих транспозонов.

Структура подвижных элементов определяет механизмы их перемещений. Можно выделить три основных механизма рекомбинации при транспозициях: репликативная транспозиция, нерепликативная транспозиция и перемещение ретротранспозонов. Хотя эти механизмы различаются в деталях, имеется общий принцип реакций транспозиции. Процесс происходит в несколько этапов. Сначала транспозаза (у ретротранспозонов ее называют интегразой) сводит вместе концы подвижного элемента и делает разрывы точно по этим концам, либо в обеих цепях, как в случае нерепликативной транспозиции, либо в одной из цепей, как при репликативной транспозиции и при интеграции ДНК ретротранспозонов. Затем транспозаза сводит в контакт концы элемента и дуплекс ДНК-мишени. При этом она делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы, отстоящие друг от друга на столько п.н., сколько их обнаруживается в прямом повторе ДНК-мишени у данного элемента. Следующий этап - обмен цепями, приводящий к рекомбинации между ДНК элемента и мишени. 3'-ОН-концы элемента соединяются с 5'-Р-концами мишени, оставляя за счет ступенчатости разрывов брешу между 5'-Р-концами элемента и 3'-ОН-концами мишени. Катализируемое транспозазой расщепление и замыкание концов цепей ДНК происходят без потери энергии фосфодиэфирной связи и не требуют АТФ, что напоминает консервативную сайт-специфическую рекомбинацию. Но сказанное не относится к брешам, которые на следующем этапе заполняются путем репаративной репликации ДНК по матрице ДНК-мишени. Репаративная репликация и легирование оставшегося после нее одноцепочечного разрыва требуют дополнительных затрат энергии. Обратим внимание на то, что заполнение брешей является причиной

возникновения описанных выше прямых повторов ДНК-мишени на концах элемента. Таким образом, мы разобрали общую основу транспозиционной рекомбинации.

Другую группу мигрирующих генетических элементов бактерий составляют эписомы - сложные плазмиды, способные к интеграции в хромосому. Эписомы, как правило, содержат IS- или Tn-элементы, и в большинстве случаев именно благодаря им, они могут включаться в состав хромосомы. Так, в половой F-эписоме *E. coli* имеется одна копия IS<sub>2</sub>, две копии IS<sub>3</sub> и одна копия Tn1000.

К мигрирующим генетическим элементам прокариот относятся также умеренные фаги. λ-фаги (лямбдоидные фаги) обычно встраиваются в одно место хромосомы, но при определенных условиях могут располагаться и в других участках генома. φ-фаги способны включаться в любые места бактериальной хромосомы, а также в ДНК многих других фагов и плазмид. Интеграция лямбдоидных фагов обеспечивается ферментной системой, состоящей из клеточных белков и белков, кодируемых геномом фага. φ-фаг во многих отношениях сходен с IS- и Tn-элементами и отличается от них только тем, что может формировать вирусные частицы.

Умеренные фаги способны вносить существенные изменения в структуру и функционирование бактериального генома благодаря двум процессам - интеграции фаговой ДНК в хромосому бактерии и трансдукции (переносу фагом бактериальных генов из одних клеток в другие). Трансдуцирующие фаги образуются в результате неточного исключения из хромосомы интегрированной фаговой ДНК. При этом часть собственной ДНК фага утрачивается, и вместо нее в фаговый геном включается участок бактериальной ДНК, достигающий иногда значительных размеров. Интегрированные фаги могут мутировать и терять способность к исключению из хромосомы, становясь вследствие этого ее неотъемлемой частью. В этом случае гены фага начинают определять функции клетки, то есть становятся ее собственными генами.

## **2. Пептидазы**

Протеолиз - ферментативный гидролиз пептидных связей в белках и пептидах - один из важных и универсальных процессов живой природы. Многообразие протеолитических ферментов обусловлено тем, что они выполняют различные функции, секретируются и действуют в самых разнообразных условиях.

Пептидазами называют ферменты, которые катализируют реакции расщепления пептидных связей белков (CO-NH) с образованием пептидов или свободных аминокислот.

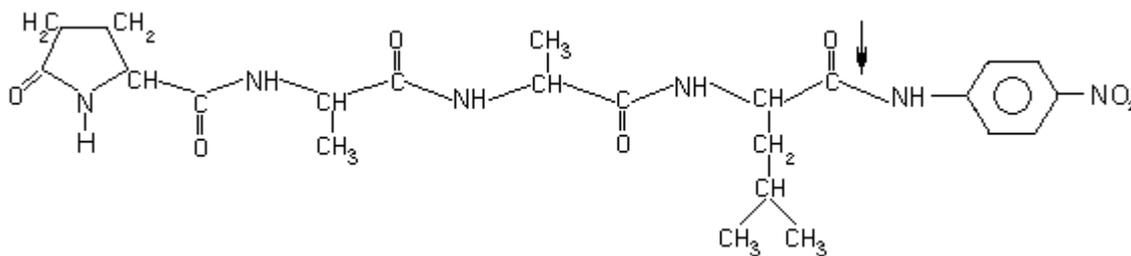


Рисунок 2 Структура субстрата Glp-AAL-pNa. Стрелкой обозначена расщепляемая связь

Согласно «Номенклатуре ферментов», подготовленной под эгидой Комиссии по номенклатуре МБС (IUB), протеолитические ферменты относят к классу гидролаз (класс 3), в составе которого они образуют подкласс пептид-гидролазы (ему присвоен номер 3.4). Следует заметить, что пептидазы плохо подчиняются обычным правилам номенклатуры ферментов по причине огромного разнообразия их структуры и механизмов действия. Поэтому классификация этих ферментов представляет значительные трудности.

Пептидазы (КФ 3.4) – ферменты, которые катализируют реакции расщепления пептидных связей белков (CO-NH) с образованием пептидов или свободных аминокислот, подразделяются на **эндопептидазы** (или протеиназы КФ 3.4.21-99) и **экзопептидазы** (КФ 3.4.11-19). Эти ферменты различаются по характеру гидролизуемых пептидных связей: если первые предпочтительно расщепляют внутренние пептидные связи молекул белков, то вторые предпочтительно атакуют их внешние концевые связи.

Полагают, что одной из основных функций эндопептидаз является образование олигопептидов со свободными N- и C-концами, по которым действуют экзопептидазы. В зависимости от pH-оптимума протеолитические ферменты разделяют также на кислые (активные при pH 2.0 – 5.0), нейтральные (проявляющие максимальную активность при pH 7.0 - 8.0) и щелочные (pH 8.5 – 10.5) пептидазы.

## 2.1. Классификация

Классификация и номенклатура всех протеолитических ферментов с известным сиквенсом представлена в виртуальной базе данных MEROPS [<http://www.merops.ac.uk/merops/merops.htm>].

Один из основных принципов классификации протеолитических ферментов – принцип субстратной специфичности. Ни одна из пептидаз не способна гидролизовать все пептидные связи белковой молекулы. Будет ли данный фермент действовать или нет, это зависит от природы химических групп, расположенных поблизости от рассматриваемой пептидной связи.

В основу классификации протеолитических ферментов положены следующие критерии:

- строение активного центра и механизм катализа;
- положение пептидной связи в молекуле белкового субстрата, на которую действует данный фермент;
- аминокислотная последовательность и эволюционные связи;
- значение pH, при котором активность фермента максимальна.

В зависимости от механизма действия и строения активного центра выделяют шесть классов протеолитических ферментов: А - аспартильные, S - сериновые, С - цистеиновые, G – глутаминовые, Т – треониновые, М – металлопептидазы и U – пептидазы с неизвестным каталитическим механизмом. Семейства протеолитических ферментов, имеющих общее происхождение, объединяют в кланы.

Аспартильные пептидазы (КФ 3.4.23) – группа протеолитических ферментов, в формировании активного центра которых участвуют два остатка аспарагиновой кислоты (Asp32 и Asp215). Все известные к настоящему времени аспартильные пептидазы относят к эндопептидазам. Большинство изученных ферментов класса аспартильных пептидаз принадлежат к семейству А1 (пепсина), характерному только для эукариотических организмов; семейство А4 составляют ферменты, секретируемые только грибами. Аспартильные пептидазы семейства А1 полностью ингибируются пепстатином, в то время как пептидазы семейства А4 устойчивы к действию этого ингибитора. Оптимум действия большинства карбоксильных пептидаз лежит в пределах pH 1,5-5,0. Эти ферменты накапливаются при pH 4,0-4,5 и быстро инактивируются при нейтральных значениях pH.

Аспартильные пептидазы представляют собой почти не содержащую  $\alpha$ -спиралей полипептидную цепь из 300-400 аминокислот с молекулярной массой 30-40 кДа. В аминокислотном составе дикарбоновые кислоты преобладают над основными; как правило, N-концевой аминокислотой является аланин. Аспартильные пептидазы секретируются в форме препробелков с относительно коротким пропептидом из 27-60 аминокислот. К аспартильным пептидазам относят белки, кодируемые генами Sap9, широко известные у патогенных грибов. Так, аспартильные пептидазы *C. albicans* Sap9 и Sap10 ассоциированы с клеточной мембраной посредством гликозилфосфатинитола. Делеции по генам Sap9 и Sap10 изменяли адгезивные свойства клеток дрожжей, препятствуя деструкции клеток эпителия человека.

Сериновые пептидазы (КФ 3.4.21) обнаружены у вирусов, бактерий и эукариот. В классе сериновых пептидаз выделяют более двадцати семейств. Все сериновые пептидазы чувствительны к специфическим ингибиторам, взаимодействующим с каталитическим остатком серина: эфирам фосфорной кислоты (диизопропилфторфосфат, DFP) и фенилметансульфогалогенидам (фенилметилсульфонилфторид, PMSF). С остатком

гистидина активного центра реагируют хлоркетоны – производные аминокислот: N $\alpha$ -тозил-L-лизин хлорметилкетон (TLCK) и тозил-L-фенилаланин-хлорметилкетон (TPCK).

Класс сериновых пептидаз принято делить на 2 семейства: химотрипсина и субтилизина. Это подразделение, прежде всего, основано на различиях аминокислотных последовательностей в области активного центра.

Пептидазы химотрипсинового типа, составляющие семейство S1, (сходные с химотрипсином по пространственной структуре, строению и механизму действия каталитического центра), характерны для животных и очень редко встречаются у растений, простейших, грибов и бактерий. Эти ферменты содержат в активном центре аминокислотные остатки гистидина, аспарагиновой кислоты и серина, что также характерно для семейств S2 и S3 класса сериновых пептидаз; по этому признаку указанные семейства объединяют в один клан SA.

Ферменты, принадлежащие к семейству S8 – субтилизина, отличаются третичной структурой расположения аминокислотных остатков в активном центре – Asp-His-Ser. Считается, что субтилизин-подобные пептидазы составляют отдельную эволюционную линию сериновых пептидаз. Его представители наиболее широко распространены среди микроорганизмов (бактерии и грибы).

Субтилизины обладают достаточно широкой субстратной специфичностью, но наиболее активно расщепляют связи, образованные гидрофобными аминокислотами (аланин, валин, лейцин). Поэтому в качестве их специфического субстрата в основном принято использовать производные, содержащие в цепи несколько остатков аланина, например, пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-*n*-нитроанилид (GlpAALpNA), бензоилоксикарбонил-аланил-аланил-лейцин-*n*-нитроанилид (ZAALpNA). Это достаточно стабильные ферменты, сохраняющие свою активность в диапазоне pH от 7,0 до 11,0, они также чувствительны к присутствию в среде ионов Ca<sup>2+</sup>, стабилизирующих их структуру. Молекулярный вес субтилизинов составляет около 27 кДа [Ballinger, 1998].

Субтилизины – это обычно внеклеточные сериновые пептидазы и под этим названием сейчас фигурируют многочисленные ферменты, выделенные и из других видов рода *Bacillus*. На сегодняшний день известно очень много разновидностей субтилизина, но наиболее часто встречаемые в литературе являются: субтилизин Карлсберг из *B. licheniformis* (также называемый субтилизин А или субтилопептидаза А), субтилизин из *B. Amylolyquefaciens* (также известный как субтилизин BPN<sup>1</sup>, Nagarse, или субтилизин В) и субтилизин из *B. subtilis* штаммов 168 (субтилизин 168 или субтилизин Е) и 72 (субтилизин 72).

Гены многих бактериальных субтилаз клонированы и секвенированы; детально изучены свойства ферментов, для некоторых белков установлена пространственная структура.

Металлопептидазы (КФ 3.4.24) считаются достаточно древней группой ферментов. Они широко распространены среди бактерий и грибов, но обычны и среди высших организмов.

В классе металлопептидаз выделяют 25 семейств. Металлопептидазы, как правило, синтезируются в неактивной форме и активируются в присутствии ионов металлов (магния, марганца, кобальта, цинка). Ферменты, принадлежащие к 13 из 25 семейств металлопептидаз, содержат консервативную последовательность НЕХХН (где Н – гистидин, Е – глутаминовая кислота, Х – другие аминокислоты), ответственную за связывание ионов металлов.

Активность металлопептидаз подавляется веществами, связывающими металлы – EDTA, 1,10-фенантролином, версеном, цитратом, фосфамидом и др.

К металлопептидазам относятся многие ферменты термофильных микроорганизмов, например термолизин. Термолизин, продуцируемый *B. stearothermophilus*, является единственным белком без дисульфидных мостиков и имеющий молекулярную массу 34 кДа. В составе белка основным атомом является Zn, встроенный между двумя сложенными локусами белка и четырех атомов Ca, которые придают термостабильность белку. Термолизин является очень стабильной пептидазой, с периодом полураспада 1 час при температуре 80 °С.

Коллагеназы, еще один важный представитель металлопептидаз, был впервые обнаружен у анаэробной бактерии *Clostridium histolyticum*, в составе токсичных продуктов. Позже было установлено, что фермент продуцируется аэробной бактерией *Achromobacter iophagus* и другими микроорганизмами, включая грибы. Действие коллагеназы очень специфично, т.е. он действует только на коллаген и желатин, и не на какой-либо из других обычных белковых субстратов. Эластаза, производимая *Pseudomonas aeruginosa* является еще одним важным членом семейства нейтральных металлопептидаз.

Цистеиновые пептидазы (КФ 3.4.22). В состав активного центра цистеиновых пептидаз входит цистеин и гистидин. Цистеиновые пептидазы активируются синильной кислотой и сульфгидрильными соединениями – восстановленным глутатионом, дитиотреитолом, 2-меркаптоэтанолом и цистеином. Цистеиновые пептидазы эффективны при нейтральных значениях pH; реже зона оптимума лежит в слабощелочной или слабощелочной среде (pH 4 – 9) в зависимости от природы гидролизуемого белка.

Цистеиновая пептидаза Клострипан с оптимумом при рН 4,9 и молекулярной массой 50 кДа была выделена из анаэробной бактерии *Clostridium histolyticum*. Фермент проявляет строгую специфичность к остаткам аргинина и отличается от папаина облигатной потребностью в кальции. Стрептопан, цистеиновая пептидаза с оптимумом при рН 8,4 и молекулярной массой 32 кДа, синтезируемая *Streptococcus* spp., показывает более широкую специфичность, в том числе в окислении инсулина и других синтетических субстратов.

Треониновые пептидазы составляют класс протеолитических ферментов, несущих в активном центре аминокислоту треонин; Ферменты этого класса являются строго внутриклеточными, и поэтому подробно не рассматриваются в данном обзоре.

Глутаминовые пептидазы составляют выделенные из пяти видов аскомицетов пептидазы, ранее относимые к семейству А4 аспартильных пептидаз. Ферменты этого класса не ингибировались специфичным для аспартильных пептидаз ингибитором-пепстатином, однако имели кислый рН-оптимум и сравнительно высокий (50-60°C) температурный оптимум.

Анализ молекулярной структуры и каталитического механизма действия этих пептидаз выявил, что активный центр ферментов этого класса представлен уникальной каталитической диадой - глутаминовая кислота и глутамин. Первоначально последовательности, кодирующие глутаминовые пептидазы, находили только в геномах грибов, однако позже обнаружили в геноме и выделили глутаминовую пептидазу из бактерии *Alicyclobacillus* sp. Исследуемый фермент обладал максимальной активностью при рН 3-4 и 60°C.

Экзопептидазы бактерий. Для работы этих ферментов необходимо присутствие свободных концевых групп в молекуле субстрата. Они не могут гидролизовать пептидные связи, находящиеся в середине полипептидной цепи. Экзопептидазы, в свою очередь, подразделяются на несколько групп, и критерием их выделения служит субстратная специфичность:

- *аминопептидазы (α-аминоацилпептид-гидролазы)* – отщепляют аминокислоту с N-конца полипептидной цепи;
- *карбоксипептидазы (пептидил-аминокислотные гидролазы)* – отщепляют аминокислоту с C-конца полипептидной цепи;
- *дипептидазы (дипептидгидролазы)* – расщепляют дипептидные субстраты;
- *дипептидил-пептидазы* – отщепляют дипептидные фрагменты либо с N-, либо с C-конца полипептидной цепи.

Аминопептидазы найдены у большого числа разнообразных микроорганизмов. В большинстве случаев аминокептидазы – внутриклеточные ферменты, хотя имеются немногочисленные сообщения об обнаружении внеклеточных аминокептидаз у бактерий.

Изучение внеклеточных пептидаз бактерий ведется различными путями: обнаружение искомой активности у имеющегося в наличии термофильного штамма, очистка и аминокислотный сиквенс фермента, клонирование и экспрессия соответствующего гена; амплификация гена кодирующего термостабильные ферменты непосредственно из природной пробы и наконец, использование полных геномов для поиска генов.

### 3. Механизм экспрессии генов пептидаз

#### 3.1. Общие понятия

Основной единицей наследственности, ответственной за формирование какого-либо элементарного признака, является **ген**, совокупность которых формирует генотип.

**Ген** (др.-греч. γένος — род) — структурная и функциональная единица наследственности живых организмов. Ген представляет собой последовательность ДНК, задающую последовательность определённого полипептида либо функциональной РНК. Гены (точнее, аллели генов) определяют наследственные признаки организмов, передающиеся от родителей потомству при размножении. При этом некоторые органеллы (митохондрии, пластиды) имеют собственную, определяющую их признаки, ДНК, не входящую в геном организма.

**Геном** — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма. Геном содержит биологическую информацию, необходимую для построения и поддержания организма. Большинство геномов, в том числе геном человека и геномы всех остальных клеточных форм жизни, построены из ДНК, однако некоторые вирусы имеют геномы из РНК.

В геноме разных видов бактерий содержание нуклеотидов варьирует от  $5,8 \times 10^5$  до  $13 \times 10^6$  п.о., что соответствует приблизительно  $10^3$  генов (1 ген на 1000 п.о.). Это в 100 раз больше, чем у вирусов, и в 1000 раз меньше, чем в среднем у эукариот. Например, размер генома вирусов —  $10^3 - 10^4$ , дрозофил —  $1,75 \times 10^6$ , дрожжей —  $1,3 \times 10^7$ , простейших (*Plasmodium falciparum*) —  $2,5 \times 10^7$ , гельминтов (нематоды) —  $1 \times 10^8$ , риса —  $4,41 \times 10^8$ , бананов —  $8,73 \times 10^8$ , табака —  $4,434 \times 10^9$ , человека —  $3 \times 10^9$  п.о. Несмотря на весьма значительную разницу в сложности организации фенотипа прокариот и эукариотических организмов, различие в количестве генов не велико.

В соответствии с международной номенклатурой, **название генов происходит от кодируемых ими признаков** и его сокращают тремя малыми курсивными буквами латинского алфавита. Аналогичные гены, присутствующие у разных видов микроорганизмов, обозначают путем добавления к названию заглавной буквы латинского алфавита (гены, контролирующие разложение лактозы у разных видов бактерий- *lac Z*, *lac Y*), аллельные варианты генов, встречающихся у представителей одного вида микроорганизмов, обозначают добавлением цифрового индекса, соответствующего порядковому номеру измененного нуклеотида (*lacZ* 195). Специфические мутации обозначаются арабскими цифрами. Фенотипические обозначения пишутся прямым шрифтом с заглавной буквы, далее следует знак + или – (либо *r-resistant* или *s-sensitive*) Гены подразделяются на структурные и функциональные в зависимости от их роли в клетке. Структурные гены детерминируют первичную структуру белков бактерий и могут быть классифицированы на две большие группы: Известно, что гены определяют структуру всех молекул, из которых состоят клетки живых организмов, контролируют все метаболические процессы и содержат программу развития организма.

В каждый момент времени любая клетка, от бактериальной до человеческой, использует лишь часть своих генов для синтеза определенных продуктов.

Невозможна ситуация, когда все гены клетки работают одновременно. Мы говорим, что те гены, которые экспрессируются - включены, а те, которые не экспрессируются – выключены. Это означает, что экспрессия генов регулируется.

**Экспрессия генов** — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: и во время транскрипции, и во время трансляции, и на стадии посттрансляционных модификаций белков.

Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации. Экспрессия генов является субстратом для эволюционных изменений, так как контроль за временем, местом и количественными характеристиками экспрессии одного гена может иметь влияние на функции других генов в целом организме.

**Транскриптóm** — совокупность всех транскриптов, синтезируемых одной клеткой или группой клеток, включая мРНК и некодирующие РНК. Понятие транскриптом может обозначать полный набор транскриптов в данном организме или специфический набор транскриптов (молекул РНК), представленный в клетках определенного типа. Транскриптом определяет природу протеома. В отличие от генома, который, как правило,

одинаков для всех клеток одной линии, транскриптом может сильно меняться в зависимости от условий окружающей среды. Поскольку транскрипты являются продуктами транскрипции генов, их совокупность представляет собой первый уровень фенотипа, т.е. первый уровень развертывания и реализации генетической информации, заключенной в геноме.

**Протеом** – совокупность всех белков данной клетки в данной фазе ее развития в данный момент времени, определяющих характер биохимических реакций, которая клетка способна выполнять (динамическая структура). Эти белки синтезируются путем трансляции молекул мРНК. Протеом является конечным продуктом экспрессии генома и включает все белки, представленные в клетке в настоящий момент времени и на данной стадии развития.

### **3.2. Экспрессия генов**

Клетки микроорганизмов находятся в непосредственном контакте с окружающей средой, зачастую весьма далекой от оптимальной для поддержания жизни. Условия среды не являются постоянными, следовательно, бактерии должны обладать способностью либо быть всегда готовыми ко всем подстерегающим их неожиданностям, либо “подстраиваться” к изменяющимся условиям. Иными словами, принципиально возможны две стратегии существования в изменяющихся условиях.

Первая – постоянная готовность к реализации изменений функций в случае изменения условий среды обитания. В этом случае значительная часть ресурсов организма большую часть времени будет расходоваться впустую на поддержание функций, не нужных в настоящий момент. Вторая стратегия - в случае необходимости реализовать определенные функции. Именно такой подход используется живыми организмами в большинстве случаев. Такая стратегия существования, на первый взгляд, должна приводить к значительной экономии ресурсов организма. Однако при таком подходе возникает необходимость в системах детекции сигналов и регуляции метаболизма, обеспечивающих максимально быстрое “включение” соответствующих метаболических путей в ответ на изменение условий среды и их “отключение”, как только в соответствующих функциях отпадет необходимость.

Если такие системы были бы слишком сложными, организму пришлось бы слишком много ресурсов расходовать на поддержание соответствующего генетического аппарата, экспрессию необходимых регуляторных белков и т.д., что свело бы на нет всю экономию.

Поскольку основную функциональную нагрузку при взаимодействии любого организма с внешней средой несут белки (либо непосредственно, либо посредством своих

ферментативных активностей), а информация о структуре и количестве белков кодируется генетическим аппаратом клетки, возможности для регуляции имеются на всем пути экспрессии кодируемой организмом информации. Иными словами, регуляция возможна как на пути от ДНК к РНК (при транскрипции), так и от РНК к белку (при трансляции). В обоих случаях экономия ресурсов организма достигается за счет выключения очень энергоемких процессов биосинтеза макромолекул - белка либо РНК (и, следовательно, белка). Кроме того, возможна также регуляция на уровне белков (как правило, аллостерических ферментов, меняющих свою активность при взаимодействии с низкомолекулярными веществами, например, конечными продуктами какого-то биосинтетического пути). Здесь происходит экономия энергии при ингибировании энергоемких ферментативных реакций.

#### РНК, содержащаяся в клетке

Типичная бактериальная клетка содержит 0,05 – 0,10 пикограмм (пг) РНК, что составляет около 6 % от общего веса клетки. Клетка млекопитающего по размерам намного больше бактериальной клетки. Она содержит и значительно больше РНК - 20-30 пг. Но это составляет только 1% от веса клетки. Важно заметить, что не все молекулы РНК составляют транскриптом клетки. Последний состоит только из белок-кодирующих молекул РНК, то есть матричных РНК, транслирующихся в белок. Большинство молекул РНК не попадает в эту категорию, поскольку являются некодирующими. Понимание различий между кодирующими и некодирующими РНК важно для обсуждения вопросов экспрессии генома.

Матричная РНК редко превышает по содержанию 4% от общего количества внутриклеточной РНК. Она является короткоживущей молекулой, то есть быстро разрушается после синтеза. Бактериальная РНК имеет полупериод жизни не более чем несколько минут. Эукариотические РНК деградируют в течение нескольких часов после синтеза. Это означает, что транскриптом не является фиксированным образованием. Транскриптом может быстро меняться, как за счет синтеза разных матричных РНК, так и за счет изменений в скорости синтеза индивидуальных матричных РНК. Некодирующие РНК более разнообразны, чем кодирующие и имеют множество различных функций, которые осуществляются непосредственно молекулами РНК. Как у эукариот, так и у прокариот имеется два основных типа некодирующих РНК:

-рибосомальные РНК. Составляют более 80 % от общего количества РНК в активно делящейся бактериальной клетке. В соответствии с названием рибосомальные РНК являются составной частью рибосом.

-транспортные РНК – небольшие молекулы, функцией которых является перенос аминокислот на рибосомы.

Рибосомальные и транспортные РНК присутствуют в клетках всех типов.

Бактерии и археи также содержат некодирующие РНК, отличающиеся от рибосомальной и транспортной РНК. Но эти молекулы не составляют существенной фракции в общем пуле РНК. У бактерий к ним относится один очень интересный тип некодирующей РНК, присутствующий у многих, если не у всех видов. Это так называемая транспортно-матричная РНК (tmRNA). Она выглядит как транспортная РНК, присоединенная к матричной РНК. Функция ее заключается в том, что она добавляет короткий пептид к белкам, которые некорректно синтезированы, участвуя, таким образом, в процессах деградации белков в бактериальных клетках.

Ферменты, ответственные за транскрипцию ДНК в РНК, называются ДНК-зависимыми **РНК-полимеразами**. Название означает, что ферментативная реакция, которую они катализируют, приводит к полимеризации РНК из рибонуклеотидов. ДНК при этом выступает в качестве матрицы, с которой копируется нуклеотидная последовательность РНК.

**РНК-полимераза** — фермент, осуществляющий синтез молекул РНК. В узком смысле, РНК-полимеразой обычно называют ДНК-зависимые РНК-полимеразы, осуществляющие синтез молекул РНК на матрице ДНК, то есть осуществляющие транскрипцию. Ферменты класса РНК-полимераз очень важны для функционирования клетки, поэтому они имеются во всех организмах и во многих вирусах. Химически РНК-полимеразы являются нуклеотидил-трансферазами, полимеризующими рибонуклеотиды на 3'-конце цепи РНК.

У бактерий один и тот же фермент катализирует синтез трёх типов РНК: мРНК, рРНК и тРНК. РНК-полимераза — достаточно большая молекула. Основной фермент содержит 5 субъединиц (~400 кДа) (рис. 3):

- $\alpha_2$ : две  $\alpha$ -субъединицы связывают остальные элементы фермента и распознают регулирующие факторы. Каждая субъединица состоит из двух доменов:  $\alpha$ СКД (С-концевой домен) связывает первый элемент промотора, и  $\alpha$ НКД (N-концевой домен) связывается с остальными компонентами полимеразы.
- $\beta$ : эта субъединица обладает собственно полимеразным действием, катализируя синтез РНК. Она осуществляет инициацию процесса и управляет элонгацией.
- $\beta'$ : неспецифически связывается с ДНК.



регуляцию процессов метаболизма в клетке при формировании адекватного – ответа микроорганизмов на меняющиеся условия окружающей среды.

Полный голоэнзим таким образом состоит из 6 субъединиц:  $\alpha_2\beta\beta'\sigma\omega$  (~480 кДа). В структуре РНК-полимеразы присутствует канавка длиной 55 Å (5,5 нм) и шириной 25 Å (2,5 нм). Именно в эту канавку помещается двойная спираль ДНК, имеющая ширину 20 Å (2 нм). На длине канавки укладывается 16 нуклеотидов.

Молекулы РНК-полимеразы не растворены в цитоплазме. Когда РНК-полимераза не используется, она связывается с неспецифичными областями ДНК в ожидании открытия активного промотора.

### 3.3. Регуляция экспрессии генов

Перед тем как обратиться к регуляции экспрессии, необходимо остановиться на некоторых терминах, принятых для прокариотических систем.

*Цистрон* — наименьшая единица генетической экспрессии. Некоторые ферменты и белки состоят из нескольких неидентичных субъединиц. Таким образом, известная формула «один ген — один фермент» не является абсолютно строгой. Цистрон — это минимальная экспрессируемая генетическая единица, кодирующая одну субъединицу белковой молекулы.

Регуляцию активности генов осуществляют *молекулярно-генетические системы управления*. На индукцию и репрессию могут влиять самые разнообразные факторы, которые называются *эффекторами*. Одни из них прямо закодированы в геноме организма (например, белки теплового шока; см. ниже), другие образуются как промежуточные продукты обмена веществ, третьи поступают в клетку в готовом виде из внешней среды или из других клеток (тканей) организма, четвертые образуются в клетке под влиянием физических факторов (экстремальных температур, ультрафиолета) и т.д. Особую группу эффекторов составляют *белки теплового шока*, которые синтезируются в клетке при различных видах стресса (при повышении температуры, при воздействии других неблагоприятных факторов). Эти белки эволюционно консервативны, они обнаружены у самых различных организмов; вероятно, они являются универсальными эффекторами.

Именно регуляцией активности генов объясняется тот факт, что, несмотря на идентичность генотипов клеток многоклеточного организма, они значительно различаются по строению и функции. Переключение синтеза с одних белков на другие лежит в основе всякого развития, будь то репродукция вирусов в зараженных клетках, рост и спорообразование у бактерий, развитие эмбрионов или дифференцировка тканей. На каждом этапе этих процессов синтезируются специфичные белки.

Существуют лишь **два типа регуляции экспрессии генов — позитивная и негативная**. Когда благодаря действию специфических регуляторных элементов уровень экспрессии генетической информации количественно возрастает, регуляция называется позитивной. Если уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов понижается, говорят о негативной регуляции. Регуляторный элемент или молекулу, участвующие в качестве «посредников» в негативной регуляции, называют негативными регуляторами; элементы, осуществляющие позитивную регуляцию— позитивными регуляторами. Единицей регуляции экспрессии генов у прокариот является **оперон**.

В 1961 году общие принципы регуляции активности генов в оперонах разработали Франсуа Жакоб и Жак Моно, французские биохимики и микробиологи, лауреаты Нобелевской премии (1965 г.) «за открытия, касающиеся генетического контроля синтеза ферментов и вирусов».



**Франсуа Жакоб**



**Жак Люсьён Монó**

*Франсуа Жакоб и Жак Моно* описали ставшую теперь классической модель оперона. Их концепция в значительной мере была основана на изучении регуляции метаболизма лактозы у кишечной палочки *E. coli*. Молекулярный механизм регуляции генов, участвующих в метаболизме лактозы, на сегодняшний день наиболее изучен.

**Оперон** — функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами. Такая функциональная организация позволяет эффективнее регулировать экспрессию (транскрипцию) этих генов. Таким образом, оперон — это участок бактериальной хромосомы, включающий следующие участки ДНК: *P* — промотор, *O* — оператор, *Z*, *Y*, *A* — структурные гены, *T* — терминатор. (В состав других оперонов может входить до 10 структурных генов и более.).

*Промотор* — это регуляторный участок ДНК, который служит для присоединения РНК-полимеразы к молекуле ДНК. В лактозном опероне присоединение РНК-полимеразы

происходит с помощью комплекса CAP-цАМФ (CAP – это специфический белок; в свободной форме является неактивным активатором, цАМФ – циклоаденозинмонофосфат – циклическая форма аденозинмонофосфорной кислоты). Типичный пример - TTGACA - 17 bp - TATAAT. В зависимости от типа промотора (а точнее, от типа распознающей его сигма - субъединицы РНК полимеразы) конкретная последовательность промотора варьирует. Размер - около 20 bp. Располагается в непосредственной близости к промотору или же перекрывается с ним. В случае негативных регуляторов, или репрессоров, оператор, как правило, располагается непосредственно за промотором, или перекрывается с ним. В случае позитивных регуляторов (активаторов) оператор обычно располагается перед промотором. В любом случае связывание регуляторного белка с оператором меняет частоту инициации транскрипции. У многих (возможно, у большинства) оперонов имеется не один, а несколько сайтов связывания с регуляторными белками, которые не обязательно располагаются рядом и могут вообще находиться по разные стороны от промотора. В этих случаях термин "оператор" в классическом смысле становится неудобным, в связи с чем, сейчас чаще просто говорят о сайтах связывания регуляторов.

**Структурные гены.** Кодируют белки, непосредственно производящие фенотипический эффект. Именно для контроля их экспрессии, собственно, и существуют оперонные структуры вместе со своими регуляторами.

**Терминатор транскрипции.** Здесь заканчивается синтез мРНК.

Ген-регулятор не входит в оперон, но является необходимой частью регуляторной системы, кодирующий регуляторный белок, связывающийся с оператором. Ген-регулятор может находиться рядом с контролируемым им опероном, но часто располагается совсем в другом участке хромосомы. Почти всегда у гена-регулятора свой промотор и терминатор.

В регуляции участвуют, как правило, и низкомолекулярные вещества-эффекторы, являющиеся либо индукторами, либо корепрессорами структурных генов. В зависимости от влияния на их работу низкомолекулярных молекул-эффекторов различают индуцибельные и репрессибельные (-руемые) опероны. В зависимости от эффекта связывания регуляторного белка с оператором опероны могут иметь негативный или позитивный контроль.

**Биологическое значение оперонов.**

С одной стороны, оперонная организация дает преимущество с точки зрения регуляции генов, объединенных функционально. Однако оперонная организация не отражает генезиса генов, так как гены в оперонах не являются родственными по

происхождению. Поэтому для клетки проблема скорее заключается в том, чтобы дифференцировать действие единой регуляторной системы на каждый отдельный ген.

Объединение функционально близких генов в опероны, видимо, постепенно сложилось в эволюции бактерий по той причине, что у них перенос генетической информации обычно осуществляется небольшими порциями (например, при трансдукции или посредством плазмид). Значение имеет само по себе сцепление функционально родственных генов, что позволяет бактериям приобретать необходимую функцию в один этап.

### **3.4. Молекулярные механизмы экспрессии генов**

Классическая догма молекулярной биологии экспрессии генома является: **ДНК→РНК→белок.**

Экспрессия всех генов начинается с транскрипции их нуклеотидной последовательности, т. е. перевода ее на язык РНК (рис. 4). При этом определенный участок одной из двух цепей ДНК используется как матрица для синтеза РНК путем принципа комплементарности оснований. В результате транскрипции генов, в которых закодирована структурная информация о белках, образуются молекулы мРНК; другие гены кодируют молекулы РНК, являющиеся частью аппарата, необходимого для трансляции мРНК с образованием белков. У прокариот, например *E. coli*, ДНК транскрибируется с помощью одного фермента-ДНК-зависимой РНК-полимеразы, который участвует в синтезе всех типов РНК.

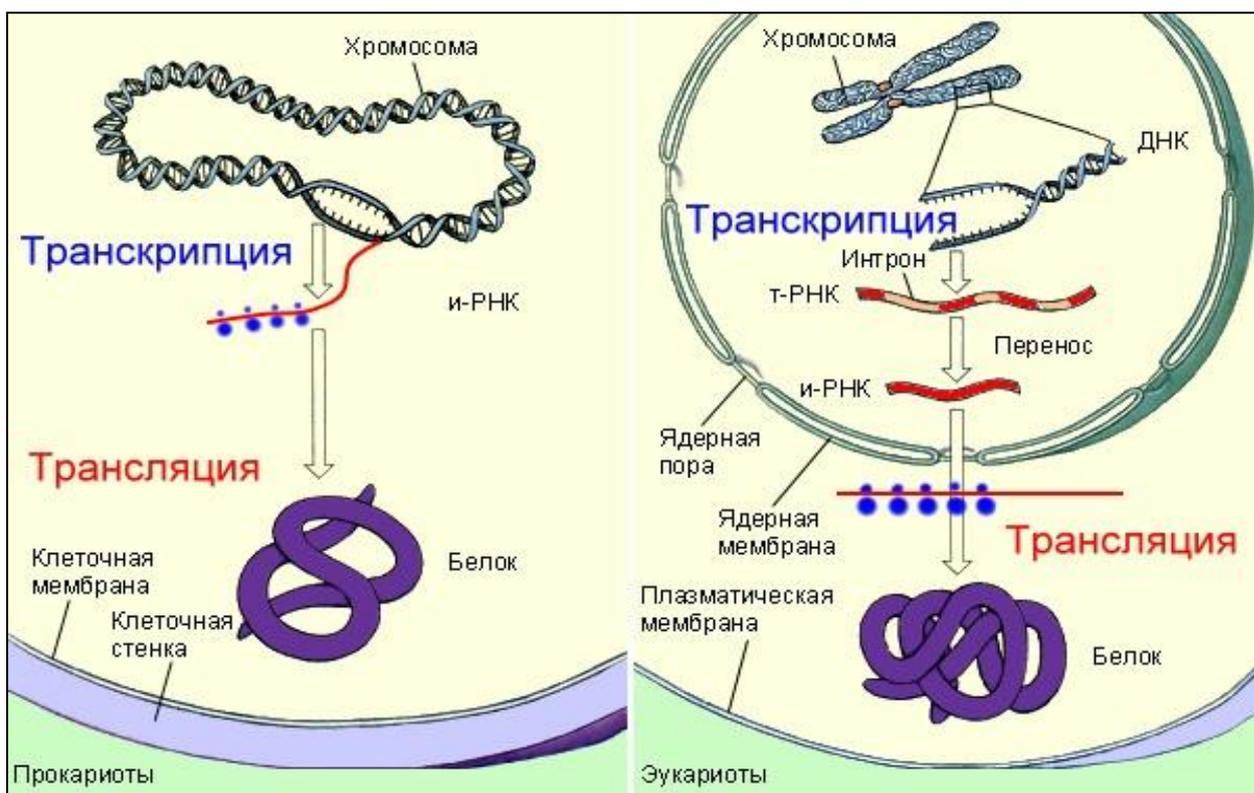


Рисунок 4 Схематичное изображение синтеза белка в клетках

В отличие от прокариот эукариоты имеют три разные ДНК-зависимые РНК-полимеразы, каждая из которых ответственна за транскрипцию генов, кодирующих разные типы клеточных РНК. Несмотря на то что механизмы синтеза РНК и матричного копирования для всех РНК-полимераз идентичны каждый фермент узнает в матрице ДНК свои характерные особенности, определяющие сайты инициации, терминации и регуляции транскрипции.

Генетический код устанавливает соответствие между нуклеотидной последовательностью данной мРНК и аминокислотной последовательностью синтезируемой на ней полипептидной цепи. Размер единиц кодирования и сами эти единицы, однозначно задающие ту или иную аминокислоту (кодоны), практически одинаковы у всех живых организмов. Более того, основные принципы и механизмы перевода генетических посланий также универсальны.

Генетический словарь содержит 64 кодона, каждый из которых образован тремя последовательными нуклеотидами (триплетами). 61 из 64 кодонов детерминируют 20 аминокислот, обнаруженных в белках, один определяет начало большинства последовательностей, кодирующих белки, и три обозначают окончания этих последовательностей.

Отличительной особенностью генетического кода является то, что каждый кодон кодирует только одну аминокислоту, т.е. код однозначен. Следовательно, зная словарь и

правила пользования им, можно перевести нуклеотидную последовательность мРНК в определенную аминокислотную последовательность. Но генетический код является вырожденным. Это означает, что одной аминокислоте могут соответствовать несколько кодонов. Вырожденность генетического кода приводит к тому, что нельзя однозначно перевести аминокислотную последовательность данного белка в нуклеотидную последовательность соответствующей мРНК.

### **Расшифровка кода с помощью тРНК**

Аминокислоты не взаимодействуют с соответствующими им кодонами непосредственно. Каждая аминокислота вначале связывается с адаптором-родственной тРНК, и образуемая при этом аминоацил-тРНК узнает «родственный» кодон путем комплементарного спаривания оснований. Таким образом, декодирование осуществляется с помощью спаривания оснований триплетных кодонов мРНК с триплетными антикодонами в аминоацил-тРНК.

Присоединение аминокислот через карбоксильные группы к родственным тРНК катализируют ферменты, называемые аминоацил-тРНК-синтетазами. При связывании тРНК с аминокислотой карбоксильная группа последней активируется, и в результате образование пептидных связей становится энергетически выгодным. Энергия же, необходимая для активации аминокислоты при присоединении ее к тРНК, поступает от гидролиза АТФ.

Присоединение аминокислот к родственным тРНК осуществляется с помощью специфических ферментов. Так, тирозил-тРНК-синтетаза присоединяет L-тирозин только к тем тРНК, которые могут спариться с тирозиновым кодоном. Аналогично лейцил-тРНК-синтетаза катализирует присоединение лейцина к молекулам тРНК, которые узнают кодоны лейцина. Таким образом, специфичность декодирования обеспечивается двумя реакциями: точным присоединением каждой аминокислоты к родственной ей тРНК и комплементарным спариванием антикодонов аминоацил-тРНК с соответствующими им кодонами в мРНК.

### **Трансляция у прокариот**

В малой субъединице рибосомы расположен *функциональный центр* (ФЦР) с двумя участками — *пептидильным (Р-участок)* и *аминоацильным (А-участок)*. В ФЦР может находиться шесть нуклеотидов иРНК, три - в пептидильном и три - в аминоацильном участках.

Различают три этапа в трансляции: инициацию, элонгацию и терминацию.

**Инициация.** Трансляция иницируется метиониновой инициаторной тРНК (рис. 5). Последовательность Шайна-Дальгарно (Ш-Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК связывается с комплементарной 3'-последовательностью рРНК.

При участии белковых факторов антикодон 3'-UAG-5' инициаторной тРНК связывается с кодоном 5'-AUG-3' мРНК, образуя комплекс с малой рибосомной субъединицей.

К образовавшемуся комплексу присоединяется большая субъединица рибосомы и начинается элонгация.

У грамотрицательных бактерий наличие последовательности Ш-Д не является обязательным для распознавания старт-кодона. Например, показано, что делеция последовательности Ш-Д из 16S рРНК не приводит к инициации трансляции по неправильным сайтам. Более того, некоторые мРНК прокариот вообще не содержат последовательности Ш-Д. По-видимому, рибосомный белок S1 связывается с AU-богатыми последовательностями, которые находятся на расстоянии 15-30 нуклеотидов до стартового кодона.

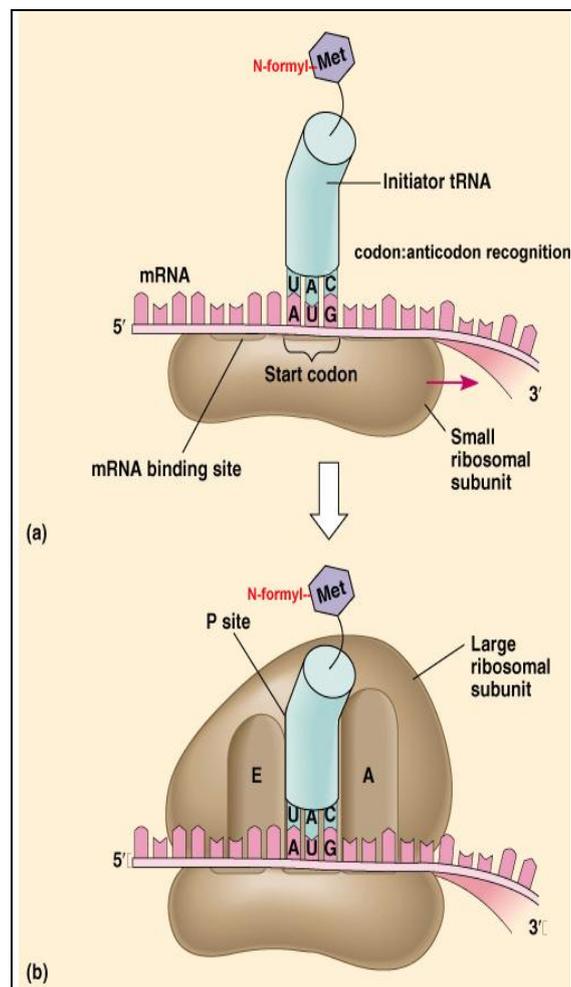
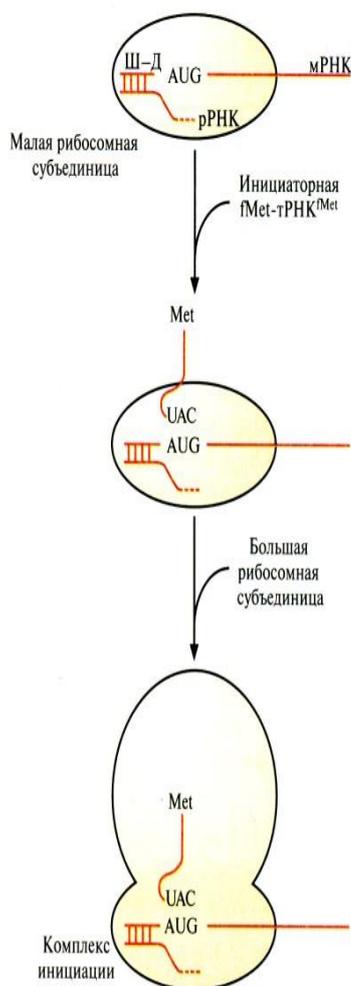


Рисунок 5 Инициация трансляции в прокариотической клетке. Последовательность Шайна-Дальгарно (Ш-Д), находящаяся вблизи 5'-конца мРНК, связывается с комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, образующей комплекс с малой рибосомальной субъединицей. Антикодон (UAC) инициаторной fMet-тРНК<sup>fMet</sup> спаривается со стартовым кодоном (AUG) мРНК. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации

**Элонгация.** В А-участок ФЦР поступает вторая тРНК, чей антикодон комплементарно спаривается с кодоном иРНК, находящимся в А-участке (рис. 6). Пептидилтрансферазный центр большой субъединицы за счет ГТФ катализирует образование пептидной связи между метионином и второй аминокислотой.

Как только образовалась пептидная связь, метиониновая тРНК отсоединяется от метионина, а рибосома передвигается на следующий кодовый триплет иРНК, который оказывается в А-участке рибосомы, а метиониновая тРНК выталкивается в цитоплазму.

На один цикл расходуется 2 молекулы ГТФ. В А-участок заходит третья тРНК, и образуется пептидная связь между второй и третьей аминокислотами. Синтез полипептида идет от N-конца к С-концу, то есть пептидная связь образуется между карбоксильной группой первой и аминогруппой второй аминокислоты.

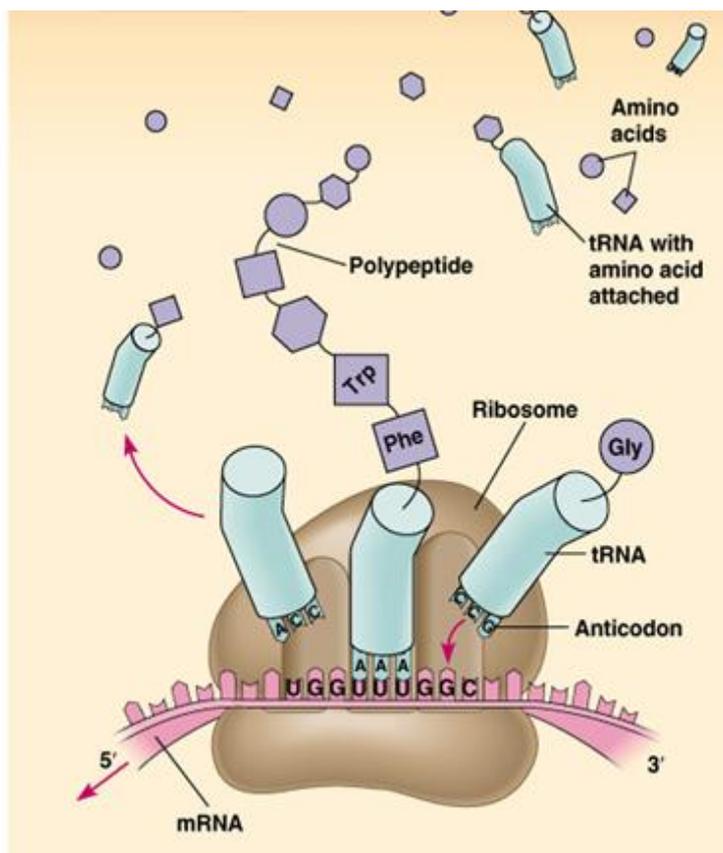


Рисунок 6 Этап «элонгация»

**Терминация.** Когда в А-участок попадает кодон-терминатор (УАА, УАГ или УГА), с которым связывается особый белковый фактор освобождения, полипептидная цепь

отделяется от тРНК и покидает рибосому (рис. 7). Происходит диссоциация, разъединение субъединиц рибосомы.

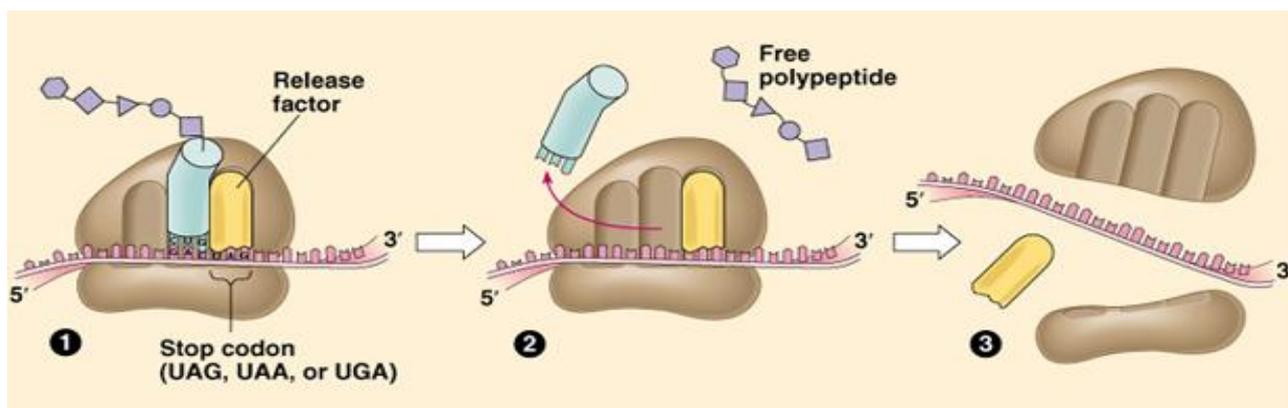


Рисунок 7 Заключительный этап синтеза - терминация

А так как мРНК прокариот часто полицистронны, то на общей мРНК может быть несколько иницирующих и терминирующих участков.

Ниже мы дополнительно остановимся на теоретических положениях и основных механизмах.

### Правильная инициация трансляции

Имеются три «рамки считывания», при которых может осуществляться перевод последовательных нуклеотидных триплетов мРНК в аминокислоты. Правильная инициация трансляции чрезвычайно важна для точной расшифровки генетического кода. Выбор рамки считывания зависит от того, какое сочетание из трех последовательных нуклеотидов выбрано в качестве первого кодона. Ниже приведены три возможные рамки считывания для последовательности GUACGUAAGUAAGUAUGGACGUA:

Рамка считывания 1 GUA CGU AAG UAA GUA UGG ACG

Рамка считывания 2 ..G UAC GUA AGU AAG UAU GGA CGU

Рамка считывания 3 .GU ACG UAA GUA AGU AUG GAC GUA

Обычно аминокислотной последовательности кодируемой полипептидной цепи соответствует только одна из рамок. Следовательно, должен существовать какой-то способ инициации трансляции с правильной рамкой считывания. У всех организмов, изученных к настоящему времени - бактерий, вирусов и эукариот - правильная рамка считывания определяется с помощью механизма, распознающего специфический кодон, который детерминирует концевую аминокислоту синтезируемого белка. Почти всегда таким кодоном является триплет AUG, отвечающий метионину. Поэтому образующийся полипептид неизменно содержит на N-конце метионин, но при последующем удалении аминоконцевой последовательности на N-конце конечного белкового продукта

оказывается аминокислота, находящаяся изначально внутри синтезированной полипептидной последовательности.

### **Трансляция кодонов и соединение аминокислот**

Последовательное спаривание разных аминоацил-тРНК с кодонами мРНК и рост полипептидной цепи осуществляются с помощью целой серии взаимно согласованных реакций. Одним из главных участников этого в высшей степени скоординированного процесса является рибосома - особый мультиферментный комплекс, состоящий из нескольких видов РНК и множества белков. Кроме того, целая армия ферментов и различных факторов катализирует мириады химических событий, необходимых для успешного синтеза белка.

Рибосомы, несущие особую инициаторную метионил-тРНК, находят инициаторный кодон в мРНК, AUG, и связываются с ним. Затем с рибосомой связывается аминоацил-тРНК, соответствующая второму кодону, и при участии рибосомной ферментативной активности остаток метионина соединяется со второй аминокислотой, все еще связанной со «своей» тРНК. В результате образуется дипептидил-тРНК. По мере продвижения рибосомы по цепи мРНК и считывания каждого последующего кодона полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту за один шаг. Элонгация прекращается в тот момент, когда рибосома достигает одного из трех терминирующих кодонов. Завершенная полипептидная цепь тотчас же высвобождает последнюю тРНК, и происходит разделение рибосомы и мРНК.

### **Регуляция экспрессии генов на разных этапах образования РНК и белка**

Клетки про- и эукариот обладают способностью к дифференциальной регуляции экспрессии генов. Так, при определенных условиях многие гены вообще не экспрессируются, а степень экспрессии других различается на несколько порядков. Изменение условий может привести к активации «молчавших» ранее генов и репрессии активно работавших. Подобная способность позволяет клеткам приспособить свои фенотипы к самым разнообразным условиям окружающей среды и физиологическим воздействиям. Дифференцированная экспрессия одного генома у многоклеточных организмов обуславливает развитие огромного множества типов клеток, имеющих специфические функции, из одной или нескольких зародышевых клеток.

Экспрессия генов, как правило, регулируется на уровне образования РНК. Обычно регулируемым этапом является инициация транскрипции, при этом регуляция осуществляется либо с помощью репрессорных белков, предотвращающих транскрипцию, либо с помощью активаторных, необходимых для ее начала. В первом случае транскрипция начинается только после того, как инактивируется репрессорный белок. Во

втором ген транскрибируется лишь тогда, когда белок-активатор находится в соответствующем функциональном состоянии. В регуляции транскрипции генов участвуют не только репрессорные и активаторные белки. В некоторых случаях сами белки-продукты генной экспрессии оказываются регуляторами транскрипции собственных генов. Эффективность транскрипции зависит также от конформационного состояния ДНК или РНК. Кроме того, регуляция синтеза РНК может осуществляться путем контроля скорости ее элонгации или с помощью «стоп-сигнала» в транскрибируемой последовательности, который может остановить транскрипцию гена. Модификация и/или процессинг, которые могут предшествовать образованию зрелой функциональной РНК, также регулируются.

Экспрессия генов может регулироваться и на уровне трансляции мРНК с образованием белков. И в этом случае специфическая регуляция, как правило, осуществляется на начальном этапе декодирования. Однако контроль может осуществляться и на разных этапах сборки полипептидной цепи. Более того, синтез тех белков, которые претерпевают посттрансляционные модификации или транспортируются к местам своего назначения внутри клетки, может регулироваться на каждом из этих этапов.

Механизмы регуляции экспрессии генов весьма разнообразны, многочисленны и очень сложны. И хотя многим из них присущи общие черты, тонкие механизмы регуляции всегда уникальны для данного гена, определенного физиологического состояния организма и условий окружающей среды. Анализ регуляторных механизмов бактериальных систем позволил выявить широкий спектр способов регуляции и координации экспрессии генов. Однако исследование механизма контроля экспрессии генов в клетках эукариот только начинается, а процессы, ответственные за дифференцировку многоклеточных организмов, пока остаются невыясненными.

### **Транскрипция: передача информации о нуклеотидной последовательности ДНК на уровень РНК**

Подавляющее число работ, в которых изучалась транскрипция, природа соответствующих реакций и их субстраты, ферментативный аппарат, сигнальные нуклеотидные последовательности, определяющие, какие области ДНК должны транскрибироваться, некоторые способы процессинга, превращающего первичные транскрипты в зрелые молекулы РНК,- было выполнено на прокариотических системах. Параллельное проведение генетических и биохимических экспериментов позволило исследовать ферменты, участвующие в транскрипции, и механизм самого этого процесса.

#### **А. Синтез РНК на ДНК-матрице**

Молекула ДНК - это физиологическая матрица для синтеза всех клеточных РНК.

Нуклеотидными предшественниками для синтеза РНК являются четыре рибонуклеозид-5'-трифосфата: АТР, ГТР, УТР и СТР. Многие РНК содержат модифицированные нуклеотиды, но изменения в основаниях и рибозных остатках происходят после полимеризации, т.е. посттранскрипционно. Тем не менее, РНК-полимеразы могут использовать рибонуклеозид-5'-трифосфаты, отличные от указанных четырех, при условии, что модифицированные основания обладают способностью к спариванию, сравнимой с таковой для аденина, гуанина, цитозина и урацила.

РНК-полимеразы катализируют реакцию присоединения 3'-ОН-группы нуклеотида, находящегося на растущем конце цепи, к α-фосфату следующего рибонуклеозид-5'-трифосфата. Многократное повторение этой реакции приводит к постепенному удлинению цепи РНК. Образование каждой новой фосфодиэфирной связи сопровождается высвобождением неорганического пирофосфата; быстрый гидролиз пирофосфата до неорганического фосфата *in vivo* делает реакцию образования фосфодиэфирной связи энергетически выгодной.

Транскрипция аналогична репликации в том смысле, что для ее осуществления также нужна ДНК-матрица. Порядок присоединения нуклеотидов определяется по принципу комплементарности. Чтобы могло происходить комплементарное спаривание каждого следующего нуклеозидтрифосфата с матричным транскрибируемым основанием, спираль ДНК во время транскрипции должна раскручиваться с помощью РНК-полимеразы. Растущая цепь РНК остается связанной с ферментом и спаренной своим растущим концом с участком матричной цепи длиной 20-30 нуклеотидов; остальная часть образовавшейся цепи не связана ни с ферментом, ни с ДНК. По мере продолжения транскрипции временно разошедшиеся цепи ДНК воссоединяются и восстанавливается исходная дуплексная структура. Таким образом, **транскрипция** - процесс консервативный, в котором сохраняется двойная спираль ДНК, а синтезированная цепь РНК отделяется. В противоположность этому репликация ДНК полуконсервативна, поскольку обе цепи исходного дуплекса распределяются по двум дочерним спиральям. Другое существенное различие между репликацией и транскрипцией ДНК состоит в том, что репликация не может начаться без заправки-прайма, а инициация синтеза РНК с помощью РНК-полимеразы происходит *de novo*, начинаясь с рибонуклеозидтрифосфата, соответствующего первому нуклеотиду в цепи РНК.

Наращивание РНК идет в направлении от 5'-к 3'-концу вдоль матричной цепи, ориентированной в направлении 3' 5', т. е. антипараллельно. Несмотря на процессивный характер элонгации (фермент не отделяется от матрицы в течение всего раунда

транскрипции), ее скорость вдоль матрицы не постоянна. В некоторых местах фермент делает остановки; возможно, это происходит там, где в одноцепочечной ДНК или в самой РНК образуются внутрицепочечные дуплексы, мешающие продвижению полимеразы. Такие паузы могут при определенных обстоятельствах приводить к преждевременной терминации транскрипции.

#### **Б. ДНК-зависимые РНК-полимеразы**

У прокариот синтез всех видов РНК: мРНК, рРНК и тРНК, а также более специализированных РНК, участвующих в процессинге РНК и регуляция экспрессии генов, катализируется ключевой ДНК-зависимой РНК-полимеразой.. Ее взаимодействие со специфическими участками ДНК - промоторами осуществляется благодаря дополнительному полипептиду –  $\sigma$ -фактору транскрипции, который специфически связывается с консервативными последовательностями нуклеотидов. Бактериальные сигма факторы представляют собой позитивные регуляторы экспрессии генов, которые взаимодействуют с кор - РНК-полимеразой и обуславливают инициацию транскрипции с последовательности определенного промотора. Главным сигма фактором у бактерий является SigA. фактор транскрипции, который требуется для экспрессии генов домашнего хозяйства. Большинство видов бактерий обладают множественными альтернативными сигма факторами транскрипции, которые ответственны за направленную экспрессию специализированных наборов генов. Так, в геноме *Bacillus subtilis* содержатся 17 альтернативных сигма факторов транскрипции, которые вовлечены во множество специфических ответов, включая стрессовый, хемотаксис, подвижность и другие. Процесс образования эндоспоры *B.subtilis* требует присутствия пяти альтернативных сигма факторов.

Разнообразные  $\sigma$ -факторы транскрипции, способные взаимодействовать с промоторами бактериальных генов, позволяют РНК-полимеразе узнавать разные промоторы и обеспечивают тонкую регуляцию процессов метаболизма в клетке при формировании адекватного ответа микроорганизмов на меняющиеся условия окружающей среды. Контроль биосинтеза белка осуществляется на различных этапах экспрессии гена: транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций, а для секретируемых белков - на уровне транслокации. Потенциал способов активации гена на уровне транскрипции оценивают путем анализа регуляторной области, с которой взаимодействуют регуляторные белки и факторы транскрипции.

#### **В. Транскрипция иницируется в особых нуклеотидных последовательностях**

Транскрипция инициируется при образовании стабильного комплекса между холоферментом и специфической последовательностью, называемой промотором и располагающейся в начале всех транскрипционных единиц (рис. 8).



Рисунок 8 Типичный промотор E.coli

Изучение нуклеотидной последовательности более чем 50 разных промоторных сайтов прокариот и мутационный анализ выявили только два консервативных участка, по-видимому, играющих ключевую роль в узнавании и функционировании промотора. Одна из этих последовательностей состоит из шести или семи пар оснований и расположена на расстоянии примерно 10 оснований до того нуклеотида, с которого начинается транскрипция (+1); этот сигнал обычно обозначают как —10-последовательность, или Прибнов-бокс в честь ее открывателя. Сравнительный анализ —10-последовательностей примерно 50 промоторов прокариот показал, что все они немного отличаются от консенсус-последовательности TATAAT. Подчеркнутый Т присутствует почти во всех промоторах, тогда как по другим позициям в каждом промоторе может наблюдаться от одного до нескольких вариантов.

Вторая последовательность, длина которой обычно равна девяти нуклеотидам, расположена на расстоянии ~35 оснований до сайта инициации (—35-последовательность) и также встречается в большинстве промоторов прокариот. Нуклеотидная последовательность сегмента между —35- и —10-участками не является критической, важно лишь расстояние между этими участками. —35-последовательность участвует в связывании РНК-полимеразы, которое предшествует перемещению фермента в Прибнов-бокс. Возможно, РНК-полимераза вызывает локальное раскручивание спирали, начиная этот процесс с Прибнов-бокса, и создает условия для инициации синтеза РНК.

#### Г. Терминация транскрипции и отделение цепей РНК

Последовательности ДНК, являющиеся сигналами остановки транскрипции, называются **транскрипционными терминаторами**. Обнаружены два типа сигналов терминации - **р-зависимый** и **р-независимый** терминаторы. Оба они имеют некоторые общие признаки. И тот и другой содержат инвертированные повторы, благодаря чему 3'-

концы РНК-транскриптов складываются с образованием **шпилек** разной длины. Стебли шпилек р-независимых терминаторов обычно содержат GC-богатые участки; один из них находится вблизи основания стебля, и к нему примыкает участок, состоящий из четырех-шести уридиловых и одного-двух адениловых остатков. В стебле р-зависимых терминаторов, напротив, содержится лишь несколько GC-пар (а иногда и не содержится вообще), а уридиновые 3'-хвосты могут отсутствовать.

Терминация транскрипции прокариот может происходить двумя способами: с участием р-фактора и без него. Соответственно различают два типа т.н. терминаторов, т.е. нуклеотидных последовательностей ДНК, на которых происходит терминация транскрипции. р-независимая терминация обеспечивается РНК шпилькой с последующей олигоуридиловой последовательностью. Шпилька, по-видимому, приводит к паузе в транскрипции, а олигоуридил-олигоадениловый дуплекс, как наименее стабильный, диссоциирует в ходе паузы. По-другому обстоит дело в случае р-зависимой терминации. На последовательности РНК должен присутствовать одноцепочечный и богатый остатками цитидина *rut*-участок, служащий местом посадки р-фактора. Сам р-фактор представляет собой гексамерную NTPазу, способную использовать энергию гидролиза нуклеозидтрифосфатов для продвижения по РНК в сторону ее 3'-конца. Когда р-фактор "догоняет" работающую РНК-полимеразу, что также случается в местах ее временной остановки, происходит терминация. В этом процессе также участвуют ассоциированные с РНК-полимеразой факторы NusA и NusG.

### **Посттрансляционная регуляция экспрессии генов**

Синтезом полноценного полипептида в результате трансляции кодирующей его мРНК рибосомами обычно завершается процесс передачи генетической информации от генов к белкам, как у бактерий, так и у высших организмов. Однако в большинстве случаев при синтезе конечного белкового продукта эукариотическими клетками используются различные его модификации, в результате которых он и приобретает требуемые свойства.

Кроме того, необходимо иметь в виду, что конечный уровень содержания конкретных белков в клетке зависит не только от скорости их биосинтеза рибосомами, но и от скорости внутриклеточной деградации. Поэтому дифференциальная регуляция стабильности белков является важнейшим механизмом, регулирующим экспрессию генов у любого организма.

В процессе трансляции растущие полипептидные цепи начинают приобретать высокоспецифическую пространственную структуру, которая формируется полностью вскоре после завершения их биосинтеза. Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название **фолдинга**. В результате фолдинга в водных растворах у водорастворимого полипептида уменьшается свободная

энергия, гидрофобные остатки аминокислот упаковываются преимущественно внутрь молекулы, а гидрофильные остатки располагаются на поверхности белковой глобулы. Гидрофобные области образуются и на внешней поверхности молекул белков, формируя полости активных центров, а также места контактов субъединиц мультимерных белков друг с другом и биологическими мембранами. Увеличение гидрофобности поверхности белков снижает их внутриклеточную стабильность, так как множество протеолитических ферментов гидролизуют с большой скоростью пептидные связи, образуемые гидрофобными аминокислотами или находящиеся вблизи от них.

### **3.5. Некоторые регуляторные механизмы экспрессии генов у прокариот**

#### **Тепловой шок, фолдинг и деградация белков**

Тепловой шок является гомеостатическим ответом клетки на индуцированное стрессовыми условиями изменение конформации белков. Этот феномен свойственен всем организмам, и его молекулярный механизм практически идентичен у бактерий, архей и эукариот (но детали рассматривать мы будем все-таки у *E. coli*). При повышении температуры клетка начинает синтезировать т.н. белки теплового шока, к которым прежде всего относятся молекулярные шапероны (DnaK, GroEL) и АТФ-зависимые протеазы (Lon, ClpAP). Эти белки выполняют две основные функции - обеспечивают фолдинг и деградацию поврежденных белков. Несмотря на полную противоположность этих двух функций результат их осуществления один – ликвидация поврежденных (и потенциально опасных для клетки) белков. Цитоплазматические протеазы по своей структуре напоминают шапероны - древние машины для фолдинга. И те, и другие распознают экспонированные гидрофобные участки неправильно свернутых или денатурированных белков.

#### *Молекулярные шапероны. Шапероны-шаперонины: разница*

Эти белки обеспечивают правильный фолдинг синтезируемых белков за счет энергии гидролиза АТФ. Они особенно важны у прокариот, где фолдинг обычно не является котрансляционным. Шапероны могут также вернуть в нормальную конформацию многие денатурированные белки (накапливающиеся при многих стрессах, включая тепловой шок), а также предотвращают агрегацию олигомеров и обеспечивают их разделение. Наконец, шапероны участвуют в секреции, поддерживая секретлируемые белки в развернутом состоянии. Шапероны из семейств Hsp70 и Hsp60 (аббревиатура из слов heat shock protein + мол.масса) присутствуют в цитоплазме в наибольших количествах.

### *Почему белкам нужна помощь при фолдинге?*

При фолдинге белки проходят через ряд промежуточных конформаций, имеющих более высокую энергию, чем конечная конформация. Поэтому для многих белков существуют локальные энергетические минимумы, в которых частично свернутый белок может задержаться надолго. Белки, требующие помощи в фолдинге, опознаются аппаратом DnaK-DnaJ-GrpE, предположительно через находящиеся в контакте с раствором гидрофобные участки. Молекулярный шаперон затем, гидролизуя АТФ, "перетасовывает" конформацию многих оснований, фактически разворачивая белок и позволяя ему свернуться заново. Если нативная конформация не достигается таким путем, белок переходит в ведение шаперонина GroES-GroEL. Полость шаперонина экранирует белок от контакта с раствором и другими субъединицами, предотвращая агрегацию и позволяя белку спокойно свернуться.

### *Специфичность шаперонов.*

Шапероны взаимодействуют предпочтительно с гидрофобными АК, хотя SecB предпочитает положительно заряженные. Неправильно свернутые или денатурированные белки опознаются по гидрофобным участкам, в норме экранированным от контакта с раствором либо внутри молекулы, либо путем контакта с гидрофобной областью другого белка или с мембраной. Недавно было показано, что DnaK опознает гидрофобный участок из 4-5 оснований, одним из которых является лейцин; такой участок должен быть фланкирован основными АК. Такие участки встречаются в среднем через каждые 36 АК, обычно в экранированных участках молекулы.

### *Шапероны и протеолиз.*

Роль шаперонов в протеолизе была продемонстрирована при изучении мутантов GroES-GroEL и DnaK - оказалось, что некоторые из них стабилизируют аномальные белки. Затем было обнаружено, что ряд цитоплазматических протеаз - ClpAP, ClpXP, HslVU - имеют одну субъединицу с активным сайтом для протеолиза, а вторую - с АТФ-зависимой шаперонной активностью. Кроме того, другие цитоплазматические протеазы, например HflB (FtsH), хоть и состоящие из одной полипептидной цепи, проявляют шаперонную активность в определенных условиях. Это свидетельствует о том, что АТФ-зависимость цитоплазматических протеаз может отражать шаперонную активность, денатурирующую субстрат, что делает его доступным для протеазы. (В принципе никакой энергии для самого протеолиза не нужно, т.к. расщепление пептидной связи - экзотермическая реакция.) Другая возможная функция АТФ - индукция конформационных изменений, ведущих к мультимеризации некоторых протеаз. Например, в отсутствие гидролиза АТФ протеаза ClpAP не может сформировать своей

нормальной цилиндрической структуры, без чего ее взаимодействие с субстратами невозможно.

Широкая субстратная специфичность шаперонов и, предположительно, протеаз отражает их способность узнавать в норме спрятанные гидрофобные области плохо свернутых или денатурированных белков. Такая общность узнавания создает дилемму: взаимодействие с шаперонами ведет к ренатурации или фолдингу, а взаимодействие с протеазами ведет к деструкции. Следовательно, клетка каким-то образом должна решить, по какому пути направить каждый поврежденный белок. Сигналы для протеолиза обычно располагаются на карбокси-конце. Как правило, это короткие последовательности из 5 неполярных оснований. Искусственное добавление таких "ярлыков" к стабильным в норме белкам делает их субстратами для протеаз. Недавно был обнаружен еще один "ярлык" такого рода. Когда молекула мРНК внезапно обрывается посреди кодирующей последовательности в результате деградации либо просто в результате преждевременной терминации транскрипции, рибосома оказывается в состоянии с занятым пептидил-тРНК Р-сайтом и свободным от кодона (и, соответственно, аминоацил-тРНК) А-сайтом (акцепторным сайтом). В этих условиях небольшая стабильная РНК, *ssrA*, действует сначала как аланил-тРНК, добавляя остаток аланина к пептиду, а затем как короткая мРНК, добавляя 10 неполярных аминокислот, за кодонами которых следует стоп. В результате образуется пептид, несущий на своем карбокси-конце 11 дополнительных АК, направляющих пептид на протеолиз (в периплазме при помощи Tsr, а в цитоплазме - HflV или ClpXP протеаз). В случае же денатурированных или агрегированных белков, не имеющих специфического "ярлыка", вопрос о том, как клетка определяет их дальнейшую судьбу, остается открытым.

#### *АТФ-зависимые протеазы*

В отличие от эукариот, где множественные системы мечения белков убихитином направляют различные субстраты к единственной цитоплазматической протеазе (26S протеазе), за распознавание субстрата у прокариот отвечают сами протеазы, поэтому их в клетке, как правило, несколько (порядка шести). Энергозависимые протеазы представляют собой, как правило, крупные олигомерные комплексы. Для всех протеаз этого класса с известной структурой протеазные сайты располагаются во внутренней камере олигомера, вход в которую слишком мал для большинства нативных (свернутых) белков. Поступление субстрата внутрь такой полости обеспечивается регуляторными АТФазными доменами (или субъединицами). Не удивительно, что именно АТФазные субъединицы отвечают за субстратную специфичность. Аминокислотные

последовательности АТФазных субъединиц разных протеаз имеют сходство, которое может свидетельствовать о сходстве механизмов их действия.

*Регуляция синтеза белков теплового шока.*

Шапероны и клеточные протеазы входят в состав регулона  $\sigma_{32}$  вместе с другими белками теплового шока. Кроме того, в состав уже рассмотренного нами ранее регулона  $\sigma_{E}$  входят периплазматическая протеаза и шаперон. В последнее время было выяснено, что эти два регулона взаимосвязаны, т.к. комплекс кода РНК-полимеразы с  $\sigma_{E}$  активирует транскрипцию гена *rpoH*, кодирующего  $\sigma_{32}$ , при экстремальных температурах (например 50°C). Многие протеобактерии имеют гомологи RpoH, и у них механизмы регуляции теплового шока являются схожими, тогда как грамположительные бактерии выработали другие, причем достаточно разнообразные, регуляторные стратегии для конкретных генов теплового шока. У клеток *E. coli*, перемещенных с 30°C на 42°C, уровень внутриклеточного  $\sigma_{32}$  резко (хотя и ненадолго) возрастает, усиливая транскрипцию с промоторов теплового шока. Возрастание концентрации  $\sigma_{32}$  является результатом стабилизации обычно весьма нестабильного  $\sigma_{32}$  и активации трансляции уже существующей мРНК *rpoH*. Поскольку быстрая деградация  $\sigma_{32}$  зависит от шаперонного комплекса DnaK-DnaJ-GrpE, стабилизация происходит из-за того, что шаперон загружается огромным количеством индуцированных стрессом неправильных белков и его уже не хватает для обработки  $\sigma_{32}$ . В фазе адаптации, следующей за фазой индукции, синтез HSP снижается негативной обратной связью на нескольких уровнях экспрессии (трансляционная репрессия, дестабилизация и, возможно, инактивация  $\sigma_{32}$ ). Количество шаперона DnaK-DnaJ в клетке невелико, поэтому он является весьма чувствительным средством мониторинга стрессов. В деградации  $\sigma_{32}$  наибольшую роль играет, вероятно, связанная с мембраной АТФ-зависимая протеаза HflB (FtsH). Несколько цитоплазматических протеаз (HslVU, ClpAP и Lon), в норме отвечающих за деградацию аномальных белков, также способны деградировать  $\sigma_{32}$ . Таким образом, внутриклеточные протеазы вместе с шапероном DnaK-DnaJ способны регулировать тепловой шок, контролируя внутриклеточную концентрацию аномальных белков. Шапероны, конечно, не деградируют  $\sigma_{32}$  непосредственно. Вступая в ассоциацию с РНК-полимеразой,  $\sigma_{32}$  стабилизируется и становится нечувствительной к протеолизу. Роль шаперонов заключается в предотвращении связывания  $\sigma_{32}$  с РНК-полимеразой, что позволяет протеазам ее деградировать. Индукция трансляции  $\sigma_{32}$  происходит независимо не только от шаперонов, но и вообще от каких бы то ни было регуляторных белков. 5' область мРНК *rpoH* имеет уникальную вторичную структуру, закрывающую рибосомсвязывающий сайт. Эта структура стабильна при нормальной температуре, но денатурирует при ее

повышении, что освобождает последовательность Шайн-Далгарно и позволяет инициировать трансляцию.

Транскрипция  $\sigma^H$  может инициироваться с четырех промоторов, один из которых зависит от  $\sigma^E$ , и регулируется белком DnaA и комплексом cAMP-CRP. Когда клетки *E. coli* подвергаются воздействию очень высоких температур, синтез почти всех белков в клетке прекращается. Исключения составляют лишь несколько белков, включая членов регулона  $\sigma^E$  ( $\sigma^{32}$  - один из таких белков). Другими членами этого регулона являются периплазматические протеаза DegP (HtrA) шаперон (пептидил-пролил цис-транс изомераза) FkpA, которые способствуют соответственно деградации и фолдингу поврежденных белков в периплазме. Мы уже рассматривали этот регулон раньше, поэтому пару слов о его регуляции при повышенной температуре. Как уже говорилось выше, активность  $\sigma^E$  контролируется парой белков, RseA и RseB. Белок цитоплазматической мембраны RseA является анти-сигма фактором и репрессирует  $\sigma^E$  регулон, связываясь с  $\sigma^E$  и предотвращая его взаимодействие с промоторами. Периплазматический белок RseB взаимодействует с RseA и способствует инактивации  $\sigma^E$ . Когда же в периплазме накапливаются аномальные белки, RseB с ними взаимодействует, освобождая RseA, что ведет к ослаблению связи последнего с  $\sigma^E$ . Кроме того, важным результатом повышения температуры является изменение свойств мембраны - она становится более лабильной (становится "жиже"), что также способствует изменению конформации RseA, ослабляющему взаимодействие с  $\sigma^E$ .

#### *Регуляция теплового шока у грамположительных бактерий.*

Регуляторные стратегии у этих бактерий существенно отличаются от таковых *E. coli*, хотя некоторые принципы остаются. У *B. subtilis* гены теплового шока могут быть разделены по крайней мере на три класса.

Гены первого класса (регулон CIRCE/HrcA) кодируют синтез основных шаперонов DnaKJ-GrpE и GroEL-GroES, и их экспрессия негативно контролируется репрессором HrcA, первым геном оперона *dnaK*. Действие этого репрессора осуществляется через связывание с оператором – инвертированным повтором CIRCE. Контроль этого регулона осуществляется при участии шаперонов, но, в отличие от контролируемой шапероном DnaKJ-GrpE деградации  $\sigma^{32}$  у *E. coli*, здесь регуляторную функцию выполняет GroEL-GroES. Этот шаперон необходим для фолдинга HrcA, а титрование шаперона образующимися в стрессовых условиях аномальными белками приводит к снижению активности HrcA и усилению экспрессии оперонов *groE* и *dnaK*. Таким образом, у грамположительных бактерий GroE, а не DnaK играет основную роль в регуляции теплового шока.

Репрессор HrcA и CIRCE-элементы были обнаружены не только у грамположительных, но и у альфа-протеобактерий, цианобактерий, хламидий и спирохет, однако их роль в регуляции теплового шока варьирует. Ко второму классу относится большая группа (50-100) генов, позитивно контролируемых сигма-фактором общего стресса  $\sigma^B$ , которые кроме тепла индуцируются еще и голоданием по глюкозе или кислороду. Этот сигма-фактор регулируется сложным каскадом белок-белковых взаимодействий (включая фосфорилирование).

К третьему классу относятся все остальные гены, не имеющие общей системы регуляции.

Опасность протеолитической деградации для растущей полипептидной цепи возникает сразу после ее появления на поверхности транслирующей рибосомы. Установлено, что  $\sim 1/3$  вновь синтезированных полипептидных цепей претерпевает протеолитический распад сразу же после завершения их синтеза рибосомами. Большинство вновь синтезированных белков избегает подобной участи благодаря образованию так называемого комплекса NAC (nascent polypeptide associated complex), ассоциированного с растущими полипептидными цепями. Имеется группа белков с молекулярными массами 21–33 кДа, которые взаимодействуют как с такой цепью, так и с самой рибосомой, предохраняя растущий полипептид от деградации путем формирования NAC. Когда же гидрофобная сигнальная последовательность синтезируемого белка достигает длины в  $\sim 70$  аминокислотных остатков и покидает NAC, с ней взаимодействует комплекс белков SRP (signal recognition particle), который не только предохраняет гидрофобную часть растущего полипептида от ранней деградации протеиназами, но и направляет ее к месту назначения – к мембранам эндоплазматического ретикула.

Растущие полипептидные цепи, у которых отсутствует сигнальная последовательность, покидая NAC, взаимодействуют с обеспечивающей фолдинг системой, в состав которой входят, в частности шапероны Hsp70 и Hsp40. Эти белки теплового шока (Hsp – heat shock protein), образуя комплекс с растущей полипептидной цепью, предотвращают их неспецифическую агрегацию и деградацию под действием внутриклеточных протеиназ, способствуя их правильному фолдингу, происходящему с участием других шаперонов. С другой стороны, Hsp70 принимает участие в АТФ-зависимом разворачивании полипептидных цепей, делая неполярные участки полипептидных цепей доступными действию протеолитических ферментов.

Различные сигнальные последовательности аминокислотных остатков обеспечивают направленную доставку вновь синтезированных белков к внутриклеточным органеллам и микрокомпартаментам. Они же оказывают влияние на характер фолдинга,

посттрансляционные модификации и метаболическую стабильность. Существуют, по крайней мере, пять биохимических процессов с участием вновь синтезируемых белков, контролируемых сигнальными последовательностями аминокислотных остатков. К ним относятся: транслокация белка через плоскость мембраны; внутриклеточный перенос белка без пересечения плоскости мембраны; химические модификации белка без гидролиза пептидных связей; расщепление некоторых или даже всех пептидных связей в белке; конформационные и иные пространственные изменения белков, включая фолдинг и олигомеризацию полипептидных цепей.

Большинство внутриклеточных белков заканчивают свое существование в результате протеолитического гидролиза, превращаясь в небольшие пептиды и свободные аминокислоты, которые далее утилизируются в синтезе новых белков. Многие протеолитические ферменты используют в качестве субстратов индивидуальные белки, проявляя тем самым высокую специфичность. Тем не менее, в клетке имеется и множество протеиназ широкой субстратной специфичности, чья неразборчивость в субстратах компенсируется их строгой компартментализацией. Они локализованы в лизосомах и вакуолях, где гидролизуют любые белки после их попадания в эти органеллы. Такая компартментализация протеолитических ферментов является жизненно важным условием существования клетки. Система протеолитической деградации внутриклеточных белков с участием протеасом и убиквитина отличается от вышеописанных систем тем, что, обладая широкой субстратной специфичностью, она безопасна для окружающих белков и реагирует на регуляторные воздействия. Ниже будет рассмотрено функционирование некоторых из этих систем.

### **Молекулярно-биологические базы данных**

В настоящее время секвенированы разные группы микроорганизмов и проведен их биоинформационный анализ.

Крупнейшей базой данных является сервер NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), созданный при поддержке Национальной библиотеки медицины (NLM, USA) и Национального Института Здоровья (NIH, USA). NCBI – обширная поисковая система по молекулярно-биологическим ресурсам, содержит спектр программ для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в режиме on-line, используя базу данных международного ГенБанка.

[www.genome.ad.jp/kegg/kegg.html](http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg.html) - Энциклопедия генов и геномов центра биоинформатики университета Киото (Япония), также содержит карты метаболических путей и ферментативных реакций для различных микроорганизмов.

## Глоссарий

**Аденозинтрифосфат (АТФ).** Рибонуклеозид-5-трифосфат, участвующий в энергетическом цикле клетки в качестве донора фосфатной группы.

**Активация аминокислоты.** АТФ-зависимое ферментативное образование эфирной связи между карбоксильной группой аминокислоты и 3'-гидроксильной группой соответствующей тРНК.

**Активный транспорт.** Требующий энергии перенос растворенного вещества через мембрану в направлении более высокой его концентрации. **Активный центр.** Участок поверхности фермента, в котором молекула субстрата связывается и претерпевает превращения.

**Акцептор электронов.** Вещество, присоединяющее электроны в окислительно-восстановительной реакции.

**Аллостерические ферменты.** Регуляторные ферменты, каталитическая активность которых меняется при нековалентном связывании специфического метаболита не в каталитическом центре, а в другом участке.

**Аллостерический центр.** Специфический участок на поверхности молекулы аллостерического фермента (отличный от активного центра), с которым связывается молекула модулятора или эффектора.

**Аминоацил-тРНК.** Эфир аминокислоты и тРНК.

**Аминоацил-тРНК –синтетаза.** Фермент, катализирующий образование аминоацил-тРНК за счет энергии АТФ.

**Аминокислоты.** Карбоновые кислоты с аминогруппой в  $\alpha$ -положении, составные элементы белков.

**Аминотрансферазы.** Группа ферментов, катализирующих перенос аминогрупп от одного метаболита к другому; их называют также трансаминазами.

**Амплификация** Многократное копирование гена в связи с повышенной потребностью организма в его продукте. Примером служат гены, кодирующие структуру рРНК.

**Амфиболический путь.** Метаболический путь, используемый как для катаболизма, так и для анаболизма.

**Амфипатическое соединение.** Соединение, молекула которого содержит и полярные, и неполярные области.

**Анаболизм.** Фаза промежуточного метаболизма, связанная с требующим затрат энергии биосинтезом компонентов клеток из молекул-предшественников.

**Антикодон.** Специфическая последовательность из трех нуклеотидов в тРНК, комплементарная кодону для аминокислоты в мРНК.

**Белок.** Полимер, состоящий из одной или нескольких полипептидных цепей, для каждой из которых характерны определенная аминокислотная последовательность и определенная молекулярная масса.

**Бокс Прибнова.** Промотор имеет два сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой нуклеотидную последовательность

*TATAAT*

*ATATTA* (ТАТА-бокс, или бокс Прибнова состоит из 6 или 7 пар оснований и расположен на расстоянии примерно 10 нуклеотидов до того нуклеотида, с которого начинается транскрипция (+1).

**Библиотека генов.** Неупорядоченный набор фрагментов ДНК, содержащий всю генетическую информацию данного вида.

**Вектор.** Автономно реплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию; например, плаزمид или ДНК умеренного фага.

**Вирион.** Вирусная частица.

**Водородная связь.** Сравнительно слабое электростатическое притяжение между электроотрицательным атомом и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом.

**Восстановление.** Приобретение соединением электронов.

**Вставочная мутация.** Мутация, вызванная вставкой дополнительного основания между двумя последовательно расположенными основаниями ДНК.

**Вторичная структура белка.** Регулярная конформация остова полипептидной цепи.

**Вырожденный код.** Код, в котором один элемент на каком-то одном языке кодируется несколькими элементами на другом языке.

**Высокоэнергетическое соединение.** Соединение, гидролиз которого в стандартных условиях сопровождается значительным уменьшением свободной энергии.

**Ген.** Участок хромосомы, который кодирует одну или несколько полипептидных цепей или молекулу РНК.

**Генетическая информация.** Наследственная информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК или РНК.

**Генетический код.** Набор кодовых слов (триплетов) в ДНК кодирующих аминокислоты белков.

**Геном.** Совокупность всех генов организма.

**Гидролиз.** Расщепление молекулы на две или несколько меньших молекул в реакции с водой.

**Гидрофильный.** «Водолюбивый»; так говорят о полярных или заряженных молекулах либо о группах, которые ассоциируются с водой.

**Гидрофобный.** «Ненавидящий воду»; так говорят о неполярных молекулах или группах, которые не растворимы в воде.

**Гистоны.** Основной класс нуклеопротеинов, ядерных белков, необходимых для сборки и упаковки нитей ДНК в хромосомы.

**Гликолиз.** Тип брожения, при котором глюкоза расщепляется на две молекулы пирувата.

**Глиоксилатный цикл.** Разновидность цикла лимонной кислоты, используемая бактериями и рядом растительных клеток для превращения ацетата в сукцинат и в конечном итоге в новый углевод.

**Глобулярный белок.** Растворимый белок, полипептидная цепь которого плотно свернута в пространстве с образованием глобулы.

**Глюкогенные аминокислоты.** Аминокислоты, углеродная цепь которых может быть превращена в процессе метаболизма в глюкозу или гликоген.

**Глюконеогенез.** Биосинтез новых углеводов из неуглеводных предшественников.

**Гомологичные белки.** Белки с одинаковой функцией и сходными свойствами у разных видов организмов, например гемоглобины.

**Гормон.** Химическое вещество, которое синтезируется в следовых количествах эндокринной тканью и выполняет роль посредника в регулировании функции другой ткани или органа.

**Двойная спираль.** Спираль, образованная двумя комплементарными антипараллельными цепями ДНК или РНК.

**Дегидрогеназы.** Ферменты, катализирующие удаление из субстрата двух атомов водорода.

**Деаминация.** Ферментативное удаление аминогрупп из аминокислот.

**Дезоксирибонуклеотиды.** Нуклеотиды, содержащие в качестве пентозного компонента 2-дезокси-D-рибозу.

**Делеционная мутация.** Мутация, возникшая в результате утраты одного или большего числа нуклеотидов из гена.

**Денатурация.** Частичное или полное расплетание полипептидной цепи (цепей) белка с утратой его специфической природной конформации.

**Денатурированный белок.** Белок, утративший свою природную конформацию под воздействием какого-либо стабилизирующего фактора, например при нагревании.

**Диализ.** Удаление молекул малого размера из раствора макромолекул за счет диффузии первых в воду через полупроницаемую мембрану.

**Дисульфидный мостик.** Корагентная поперечная связь, образующаяся между цистеиновыми остатками двух полипептидных цепей.

**ДНК-лигаза.** Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-концом одного фрагмента ДНК и 5'-концом другого в условиях, когда оба фрагмента комплементарно спарены с цепью-матрицей.

**ДНК-полимераза.** Фермент, который катализирует протекающую в присутствии матрицы реакцию синтеза ДНК из предшественников - дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов.

**ДНК-репликационная система.** Полный набор ферментов и специализированных белков, необходимых для репликации ДНК.

**Донор протонов.** Вещество, отдающее протон в кислотноосновной реакции, т.е. кислота.

**Донор электронов.** Донор электронов в окислительно-восстановительной реакции.

**Дыхание.** Окислительное расщепление молекулы питательного вещества с высвобождением энергии под воздействием кислорода.

**Дыхательная цепь.** Электронпереносная цепь, состоящая из последовательности белков-переносчиков электронов, которые переносят электроны от субстрата к молекулярному кислороду в аэробных клетках.

**Жирная кислота.** Алифатическая кислота с длинной углеродной цепью, остатки которой содержатся в природных жирах и маслах.

**Зимоген.** Неактивный предшественник фермента; например, пепсиноген.

**Изозимы (изоферменты).** Множественные формы фермента, отличающиеся друг от друга по сродству к субстрату, по максимальной активности или по регуляторным свойствам.

**Изомераза.** Фермент, катализирующий превращение соединения в его структурный изомер.

**Изоэлектрическая точка.** Значение рН, при котором растворенное вещество не имеет суммарного электрического заряда.

**Индуктор.** Молекула, способная вызывать синтез данного фермента; обычно это субстрат фермента.

**Индукцибельный фермент.** Фермент, который не вырабатывается клеткой (т. е. его синтез подавлен) до тех пор, пока его синтез не индуцируется своим субстратом или другим близкородственным соединением.

**Иницирующие факторы.** Специфические белки, необходимые для инициации синтеза полипептида рибосомами.

**Иницирующий кодон.** Триплет AUG, кодирующий первую аминокислоту в полипептидной цепи, которой у прокариот является N-формилметионин, а у эукариот - метионин.

**Интрон.** Вставочная последовательность в гене; она транскрибируется, но вырезается до процесса трансляции.

**Катаболизм.** Фаза метаболизма, включающая деградацию молекул питательных веществ и сопровождающаяся выделением энергии..

**кДНК (комплементарная ДНК).** ДНК синтезируемая обычно с помощью обратной транскриптазы и комплементарная данной мРНК; используется для клонирования ДНК.

**Килобаза Кб (kb)** - сокращенное обозначение единицы длины ДНК или РНК, равной 1000 пар оснований.

**Киназа.** Фермент, катализирующий фосфорилирование молекулы-акцептора при помощи АТР.

**Конститутивные ферменты.** Ферменты главных метаболических путей, которые всегда присутствуют в нормальных клетках.

**Кофактор.** Низкомолекулярное термостабильное неорганическое или органическое соединение, необходимое для проявления активности фермента.

**Кофермент.** Кофактор органической природы, необходимый для действия определенных ферментов; часто в качестве составной части содержит витамин.

**Коэффициент седиментации.** Физическая константа, определяющая скорость осаждения частицы в центрифуге при заданных условиях.

**Липкий конец.** Свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарный одноцепочечному концу противоположной полярности этой же или другой молекулы ДНК.

**Матрица.** Макромолекулярный шаблон для синтеза информационной макромолекулы. Матричная РНК (мРНК). Класс молекул РНК, каждая из которых комплементарна одной цепи клеточной ДНК и служит для переноса генетической информации от хромосомы к рибосомам.

**Мембранный транспорт.** Перенос растворенного вещества через мембрану, осуществляемый обычно с помощью особого белка мембраны.

**Метаболизм.** Полная совокупность катализируемых ферментами превращений органических молекул питательных веществ в живых клетках.

**Мультиферментная система.** Последовательность связанных между собой ферментов, участвующих в данном метаболическом пути.

**Мутаген.** Химический агент, способный вызывать изменения в гене, т.е. мутацию.

**Мутация.** Наследуемое изменение в хромосоме.

**Нативная конформация.** Биологически активная конформация белковой молекулы.

**Негативная регуляция** Если уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов понижается, говорят о негативной регуляции.

**Нонсенс-кодон.** Кодон, который не кодирует ни одну из аминокислот, а указывает место окончания синтеза полипептидной цепи.

**Нуклеаза.** Фермент, способный гидролизовать межнуклеотидные связи в нуклеиновой кислоте.

**Нуклеиновые кислоты.** Природные полинуклеотиды, в которых нуклеотидные остатки соединены между собой в определенной последовательности фосфодиэфирными связями.

**Нуклеозид.** Соединение, состоящее из пуринового или пиримидинового основания, ковалентно связанного с пентозой.

**Нуклеозидифосфатсахар.** Переносчик молекулы сахара, выполняющий роль кофермента в ферментативных реакциях синтеза полисахаридов и производных сахаров.

**Нуклеоид.** Ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной.

**Нуклеотид.** Нуклеозид, фосфорилированный по одной из гидроксильных групп пентозы.

**Н.п.** Нуклеотидная последовательность

**Обратная транскриптаза.** Синтезируемая ретровирусами РНК-зависимая ДНК-полимераза, способная катализировать синтез ДНК, комплементарной РНК.

**Окислительное фосфорилирование.** Ферментативное превращение ADP в АТФ, сопряженное с переносом электронов от субстрата к молекулярному кислороду.

**Оксигеназа.** Фермент, катализирующий реакцию, в ходе которой в акцепторную молекулу вводится кислород.

**Оператор.** Область ДНК, которая взаимодействует с белком-репрессором, благодаря чему регулируется экспрессия гена или группы генов.

**Операторный локус** Определенный участок последовательности двуцепочечной ДНК, участвующий в регуляции транскрипции структурных генов.

**Оперон.** Единица генетической экспрессии, состоящая из одного или нескольких связанных между собой генов, а также из промотора и оператора, которые регулируют их транскрипцию.

**Оптимум рН.** Значение рН, при котором фермент проявляет максимальную каталитическую активность.

**Оптическая активность.** Способность вещества вращать плоскость плоскополяризованного света.

**Пентозофосфатный путь.** Путь окисления глюкозо-6-фосфата с образованием пентозофосфатов.

**Пептид.** Две или большее число аминокислот, ковалентно соединенных друг с другом пептидными связями.

**Пептидаза.** Фермент, катализирующий гидролиз пептидной связи.

**Пептидная связь.** Замещенная амидная связь между  $\alpha$ -аминогруппой одной аминокислоты и  $\alpha$ -карбоксильной группой другой.

**Перемещающийся элемент (транспозон).** Фрагмент ДНК, который может менять свое положение в геноме.

**Плаزمида.** Внехромосомная независимо реплицирующаяся небольшая кольцевая молекула ДНК.

**Позитивная регуляция.** Если уровень экспрессии генетической информации количественно возрастает, регуляция называется позитивной.

**Последовательность Шайна – Дальгарно.** Последовательность нуклеотидов, находящаяся вблизи 5'-конца мРНК связывающаяся с комплементарной 3'-последовательностью рРНК.

**Промотор.** Участок ДНК, с которым может связываться РНК-полимераза, инициируя тем самым транскрипцию.

**Протеасома.** Очень крупная мультисубъединичная протеаза, присутствующая в клетках эукариот, архей и некоторых бактерий.

**Простагландины.** Класс жирорастворимых гормоноподобных регуляторных молекул, являющихся производными арахидоновой кислоты и других полиненасыщенных жирных кислот.

**Протеинкиназы.** Ферменты, катализирующие фосфорилирование определенных аминокислотных остатков в ряде белков.

**Протеолитический фермент.** Фермент, катализирующий гидролиз белков или пептидов.

**Протопласт.** Содержимое бактериальной клетки, за исключением внешней клеточной оболочки (клеточной стенки), однако при сохранении клеточной (плазматической) мембраны.

**Разобщающий агент.** Вещество, которое разобщает процессы фосфорилирования ADP и транспорта электронов, например 2,4-динитрофенол.

**Регуляторный ген.** Ген, продукт которого принимает участие в регуляции экспрессии другого гена, например ген, кодирующий белок-репрессор.

**Регуляторный локус.** Участок молекулы ДНК, кодирующий информацию о белке-репрессоре.

**Регуляторный фермент.** Фермент, обладающий регуляторной функцией благодаря его способности изменять свою каталитическую активность в результате нековалентного или ковалентного присоединения особого модулирующего метаболита.

**Рекомбинантная ДНК.** ДНК, образованная в результате соединения генов в новой комбинации.

**Рекомбинация.** Соединение генов, группы генов или частей генов в результате биологического процесса или в ходе лабораторного манипулирования, приводящее к новым комбинациям генов.

**Репликация.** Синтез дочерней молекулы двухцепочечной ДНК, идентичной родительской двухцепочечной ДНК.

**Репрессибельный фермент.** Фермент, синтез которого ингибируется в том случае, если продукт катализируемой им реакции легко доступен бактериальной клетке.

**Репрессор.** Белок, который связывается с регуляторной последовательностью (оператором) гена и блокирует его транскрипцию.

**Рестриктирующие эндонуклеазы.** Эндодезоксирибонуклеазы, узнающие специфическую нуклеотидную последовательность и вызывающие расщепление обеих цепей ДНК в сайтах, которые определяются нуклеотидными последовательностями, обладающими симметрией второго порядка относительно центра. Эти ферменты являются важным инструментом генетической инженерии.

**Рилизинг-факторы (факторы терминации).** Входящие в состав цитозоля факторы белковой природы, необходимые для высвобождения готовой полипептидной цепи из рибосомы.

**Сайт.** Участок нуклеотидной последовательности.

**Сателлитная ДНК.** Высокоповторяющиеся нетранслируемые участки ДНК в эукариотических клетках.

**Сбраживание.** Анаэробное расщепление молекул питательного вещества, например глюкозы, сопровождающееся выделением энергии.

**Сведберг (S).** Единица скорости седиментации частицы в центрифуге.

**Сдвиг рамки.** Мутация, которая обусловлена вставкой или потерей одной или нескольких пар нуклеотидов; приводит к смещению рамки считывания кодонов при биосинтезе белка, в результате чего образующийся белок, начиная с кодона, подвергшегося изменению, имеет искаженную аминокислотную последовательность.

**Сигнальная последовательность.** 5/-лидерная аминокислотная последовательность полипептида, сигнализирующая о месте назначения новосинтезированного белка; с ее помощью белок проходит сквозь определенную мембрану.

**Структурный ген.** Ген, кодирующий белки и РНК.

**Субстрат.** Определенное соединение, на которое действует фермент.

**Терминирующая последовательность.** Последовательность ДНК, которая находится на конце транскрипционной единицы и служит сигналом окончания транскрипции.

**Терминирующие кодоны.** Три кодона UAA, UAG и UGA, которые служат сигналами окончания синтеза полипептидной цепи.

**Топоизомеразы.** Ферменты, способные осуществлять положительное или отрицательное сверхскручивание колец двухцепочечной ДНК.

**Трансаминазы.** Ферменты, катализирующие перенос аминогрупп от  $\alpha$ -аминокислот к  $\alpha$ -кетокислотам; их также называют аминотрансферазами.

**Транскрипционный контроль.** Регуляция белкового синтеза при помощи регуляции образования мРНК.

**Транскрипция.** Ферментативный процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в одной цепи ДНК, используется для синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности в цепи мРНК.

**Транслоказа.** Фермент, вызывающий какое-либо движение, например перемещение рибосомы вдоль мРНК.

**Трансляционный контроль.** Регуляция синтеза белка за счет изменения скорости его трансляции в рибосоме.

**Трансляция.** Процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в молекуле мРНК, направляет синтез соответствующей аминокислотной последовательности в белке.

**Транспозиция.** Перемещение гена или группы генов из одного места генома в другое.

**Транспортная РНК (тРНК).** Класс молекул РНК (мол. масса 25000-30000), каждая из которых на первом этапе белкового синтеза ковалентно соединяется со специфической аминокислотой.

**Т.п.о.** Тысячи пар оснований

**Факторы инициации.** Специфические белки, необходимые для инициации синтеза полипептида в рибосомах.

**Флавинадениндинуклеотид (FAD).** Кофермент ряда окислительно-восстановительных ферментов, содержащий рибофлавин.

**Фосфорилирование.** Образование фосфатного производного биомолекулы обычно за счет ферментативного переноса фосфатной группы от АТФ.

**Фосфорилирование в дыхательной цепи.** Окислительное фосфорилирование, т.е. фосфорилирование ADP, сопряженное с переносом электронов от субстрата к кислороду.

**Фосфорилирование на уровне субстрата.** Фосфорилирование ADP и некоторых других нуклеозид-5'-дифосфатов, сопряженное с дегидрированием органического субстрата и протекающее независимо от переноса электронов.

**Фосфолиз.** Ферментативное расщепление соединения в результате взаимодействия с фосфатом, аналогичное гидролизу.

**Фотосинтетическое фосфорилирование (фотофосфорилирование).** Ферментативное образование АТФ из ADP, сопряженное со светозависимым переносом электронов в фотосинтезирующих организмах.

**Функциональная геномика.** Реализация информации, записанной в геноме, от гена — к признаку.

**Хемиосмотическое сопряжение.** Сопряжение синтеза АТФ и переноса электронов через мембрану за счет электрохимического градиента  $H^+$

**Хиломикрон.** Компонент плазмы крови, представляющий собой крупную каплю триацилглицеролов, стабилизированную с помощью оболочки из белка и фосфолипида.

**Химерная ДНК.** Рекомбинантная ДНК, содержащая гены из двух разных видов организмов.

**Химерный белок.** Ковалентно соединенные белки из разных видов организмов; их синтез кодируется химерной ДНК.

**Хроматин.** Нитевидный комплекс ДНК, гистонов и других белков, составляющий основу эукариотических хромосом.

**Хроматография.** Процесс, при котором сложные смеси молекул могут быть разделены путем многократно повторяющихся актов распределения между стационарной и движущейся фазами.

**Хромосома.** Одна большая молекула ДНК, содержащая ряд генов и выполняющая функцию хранения и передачи генетической информации.

**Центральная догма.** основополагающий принцип биохимической генетики, согласно которому генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее к белкам.

**Циклический АМР (циклический аденилат).** Вторичный посредник внутри клеток; его образование при помощи аденилатциклазы стимулируется некоторыми гормонами.

**Цистрон.** Это минимальная экспрессируемая генетическая единица, кодирующая одну субъединицу белковой молекулы.

**Цитохромы.** Гемосодержащие белки, выполняющие роль переносчиков электронов при дыхании и фотосинтезе.

**Четвертичная структура.** Пространственное расположение подогнанных друг к другу субъединиц олигомерного белка.

**Число оборотов.** Число, указывающее, сколько раз молекула фермента преобразует молекулу субстрата за 1 мин в условиях, когда фермент проявляет максимальную активность.

**Экзергоническая реакция.** Химическая реакция, сопровождающаяся отрицательным изменением стандартной свободной энергии («нисходящая» реакция).

**Экзонуклеаза.** Фермент, гидролизующий только концевую фосфодиэфирную связь нуклеиновой кислоты.

**Экспрессия генов.** Это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

**Электрофорез.** Перемещение заряженных растворенных веществ в электрическом поле; часто используется для разделения смесей ионов.

**Электрохимический градиент.** Сумма градиентов концентрации и электрических зарядов при переносе ионов через мембрану.

**Элюат.** Жидкость, вытекающая из хроматографической колонки.

**Эндонуклеаза.** Фермент, способный гидролизовать внутренние фосфодиэфирные связи в нуклеиновых кислотах.

**Энергия активации.** Количество энергии (в килокалориях), необходимое для того, чтобы перевести все молекулы, содержащиеся в 1 моле реагирующего вещества, в состояние переходного комплекса.

**Энергия связи.** Энергия, необходимая для разрыва связи.

**Энтальпия.** Содержание тепла в системе.

**Энтропия.** Мера степени неупорядоченности системы.

**Эффектор (модулятор).** Метаболит, который, связываясь с аллостерическим центром регуляторного фермента, меняет его кинетические характеристики.

## Литература:

1. Агол В.И., Богданов А.А. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот/ В.И. Агол, А.А. Богданов.- М.: Высш.шк., 1990. - 352 с.
2. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки: в 3 т./Б. Албертс, Д.Брей, Дж. Льюис-М.: Мир, 1994.
3. Белясова Н.А. Биохимия и молекулярная биология/Н.А. Белясова. - Минск: Книжный дом, 2004. - 415с.
4. Березин И.В., Савин, Ю.В. Основы биохимии/ И.В. Березин, Ю.В. Савин. - М.: Изд-во МГУ, 1990.-235с.
5. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия/Т.Т.Березов, Б.Ф. Коровкин.- М.: Медицина, 1998. - 543с.
6. Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Анализ полных геномов – очередной этап в развитии микробиологии// Вестник российской академии наук, 2010. Т. 80 № 11 с. 977-984.
7. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции/ Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. - 624 с.
8. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология, принципы и применение. Москва «Мир» 2002. - 589 с.
9. Диксон М., Уэбб, Э. Ферменты: в 3 т./М. Диксон, Э.Уэбб. – М.: Мир, 1982.
10. Жеребцов Н.А. Биохимия/ Н.А. Жеребцов Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного ун-та, 2002. – 696с.
11. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: в 3т./ П. Зенгбуш. – М.: Мир,1982.
12. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. - М.: Высш.шк., 1998.-479с.
13. Кольман Я. Наглядная биохимия/ Я. Кольман. – М.:Мир,2000. - 469 с.
14. Коничев А.С., Севастьянова Г.Н. Молекулярная биология/ Коничев А.С., Севастьянова Г.Н. – М.: Академия, 2005. - 400с.
15. Кретович В.Л. Биохимия растений/ Кретович В.Л.- М.:Высшая шк., 1986. - 445с.
16. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. / Ленинджер А. - М.: Мир, 1985.
17. Лещук Р.И. Практикум по биохимии/ Лещук Р.И., Вайшла О.Б., Войцековская С.А. – Томск, 2002. - 186 с.
18. Маликова Л.А., Марданова А.М., Соколова О.В., Балабан Н.П., Шарипова М.Р. Особенности биосинтеза внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilus* КММ 62 // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки 2006. Т. 148, № 2 с. 90-101.
19. Марданов А.В., Равин Н.В. Роль геномики в исследовании разнообразия и эволюции архей // Биохимия. 2012. № 8. С. 965-980.
20. Марданова А. М., Маликова Л. А., Балабан Н. П., Замалютдинова Н. М., Шарипова М. Р. Субтилизиноподобная протеиназа, секретируемая штаммом *Bacillus pumilus* КММ 62 на разных фазах роста // Биоорганическая химия, 2012. Т. 38 № 2 . С. 234-242.
21. Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Биохимические свойства субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedins*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* в стационарной фазе роста Биохимия 2009. Т. 74. № 3. С. 308-315.
22. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / Под ред. А.С. Спирина. М.: Высш. шк. 1990. - 352 с.
23. Морозкина Е.В, Слуцкая Э.С., Фёдорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королёва О.В. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение //Прикладная биохимия и микробиология. 2010.

- Т. 46. № 1. С. 5-20.
24. Николаев А.Я. Биологическая химия. Москва «Медицинское информационное агентство» 2004. - 568 с.
  25. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия/ Ю.А. Овчинников.- М.: Просвещение, 1987. - 812 с.
  26. Основы биохимии/ под ред. Анисимова А.А. – М.: Высшая шк., 1986. - 551с.
  27. Патрушев Л.И. Биосинтез белка в искусственных генетических системах // Проблема белка. М.: Наука, 1995. Т.1 Химическое строение белка. С. 354–478.
  28. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000. - 830 с.
  29. Плакунов В.К. Основы энзимологии/ Плакунов В.К. –М.: Логос, 2001. - 128 с.
  30. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии/ Пустовалова Л.М. – Ростов на Дону: Феникс,1999. - 544 с.
  31. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. СПб.: СПбГТУ, 1999. - 521 с.
  32. Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики по курсу лекций для студентов биологического факультета МГУ. Очерк 5. Трансгеноз и новая молекулярная генетика // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1996. № 4. С. 3–32.
  33. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х т. Пер. с англ. - М.: Москва «Мир» 1998.
  34. Современное естествознание. Молекулярные основыбиологических процессов. Энциклопедия: в 10 т. – М.: Изд. Дом Магистр – Пресс, 2000.- 408с.
  35. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. - 303 с.
  36. Справочник биохимика/под ред. Р. Досон. - М.: Мир,1991. - 543с.
  37. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков – 3-е изд. – М. Изд-во Моск. ун-та: Наука, 2005. – 336 с.
  38. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков - М.: Высш.шк., 1996. - 335с.
  39. Страйер Л. Биохимия: в 3 т./ Страйер Л. - М.: Мир,1985.
  40. Строев Е.А. Биологическая химия/ Строев Е.А. – М.:Высшая шк., 1986. - 479с.
  41. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю. Биоорганическая химия / Тюкавкина Н.А., Бауков Ю. – М.: Дрофа, 2004. - 464 с.
  42. Уайт А. Основы биохимии: в 3 т./ Уайт А. - М.: Мир,1981.
  43. Филлипович Ю.Б. Основы биохимии/ Филлипович Ю.Б.– М.: Высшая шк., 1985. - 503с.
  44. Шабарова З.А., Богданов А.А., Золотухин А.С. Химические основы генетической инженерии. М.: Изд-во МГУ, 1994. - 219 с.
  45. Шишкинская Н.А. Словарь биологических терминов. /Саратов, изд-во «Лицей», 2005. - 284 с.
  46. Щербаков В.Г. Биохимия/ Щербаков В.Г. – СПб.:ГИОРД, 2003. - 605 с.
  47. Dunaevsky Y.E., Golubeva E.A., Gruban T.N., Beliakova G.A. & Belozersky M.A. // J. Russian Phytopathol. Soc. 2001.V. 2. P. 39-43.