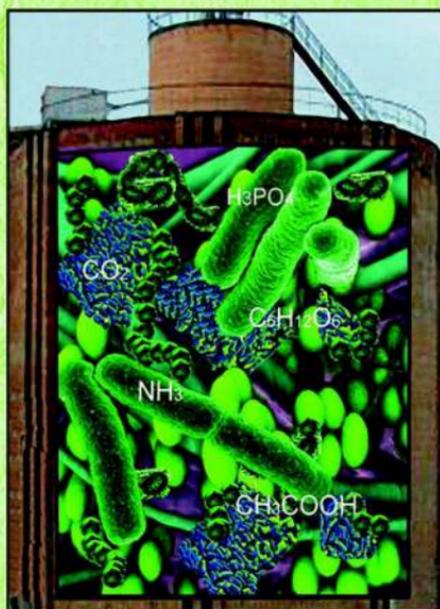


НОВАЯ  
УНИВЕРСИТЕТСКАЯ  
БИБЛИОТЕКА

В.К. ПЛАКУНОВ  
Ю.А. НИКОЛАЕВ

# ОСНОВЫ ДИНАМИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

**Новая  
Университетская  
Библиотека**

# ОСНОВЫ ДИНАМИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ



Москва  
Логос  
2020

УДК 577  
ББК 28.080.3  
П55

*Серия основана в 2003 году*

Рецензенты:

*Н.Б. Градова*, доктор биологических наук, профессор (кафедра биотехнологии Российского технологического университета им. Д.М. Менделеева)

*Д.Т. Звягинцев*, доктор биологических наук, профессор (кафедра биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова)

**Плакунов В.К.**

П55 Основы динамической биохимии: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2020. – 216 с. (Новая университетская библиотека).

ISBN 978-5-98704-493-3

Рассмотрены основные положения динамической биохимии – науки о путях и механизмах биохимических процессов, протекающих в клетке. Представлены не только общая характеристика метаболической активности, но и разделы, связанные с регуляцией метаболизма и физиологических функций клеток. Раскрыты механизмы глобальной регуляции метаболизма, характерные для биопленок. Показана роль биохимических знаний в биохимических процессах.

Для студентов высших учебных заведений, получающих образование по направлениям «Биология», «Экология и природопользование», «Химическая технология и биотехнология»; специальностям «Биология», «Физиология», «Микробиология», «Биотехнология», «Биоэкология». Представляет интерес для специалистов, научных работников, аспирантов и докторантов, нуждающихся в фундаментальной биохимической подготовке.

УДК 577  
ББК 28.080.3

ISBN 978-5-98704-493-3

© В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев, 2020  
© Логос, 2020

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Список сокращений</b> .....	6
<b>Предисловие</b> .....	7
<b>Введение</b> .....	9
<b>Глава 1. Статическая биохимия клетки</b> .....	13
1.1. Строение и состав живой клетки .....	13
1.2. Понятие о компартментации. Основные клеточные органеллы... 33	
<b>Глава 2. Основы энзимологии</b> .....	40
2.1. Ферменты – катализаторы биохимических реакций.....	40
2.2. Кинетика действия ферментов.....	50
2.3. Ингибирование ферментов.....	55
<b>Глава 3. Организация процессов метаболизма</b> .....	58
3.1. Принципы биоэнергетики .....	58
3.2. Аэробные энергетические процессы .....	70
3.3. Анаэробные энергетические процессы.....	78
3.4. Фотосинтез.....	100
3.5. Процессы конструктивного метаболизма .....	107
3.6. Азотфиксация .....	112
3.7. Транспорт субстратов и продуктов. ....	116
<b>Глава 4. Регуляция процессов метаболизма</b> .....	129
4.1. Регуляция биосинтеза белков на этапе транскрипции .....	129
4.2. Регуляция биосинтеза белков на этапе трансляции.....	147
4.3. Регуляция активности биохимических катализаторов .....	156
<b>Глава 5. Механизмы глобальной регуляции процессов метаболизма</b> .....	167
5.1. Общие сведения .....	167
5.2. Механизмы кислородной регуляции метаболизма у микроорганизмов .....	170
5.3. Апоптоз (запрограммированная гибель клетки).....	178
5.4. Биопленки .....	186
<b>Глава 6. Значение биохимии для биотехнологии</b> .....	201
6.1. Общие сведения .....	201
6.2. Применение биохимических подходов в биотехнологии .....	203
<b>Литература</b> .....	214

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПМ	– внеклеточное полимерное вещество (матрикс)
РНКП	– РНК полимеразы
ТЭГ	– трансмембранный электрохимический градиент
ЦТК	– цикл трикарбоновых кислот
ADP	– аденозиндифосфат
AMP	– аденозинмонофосфат
ATP	– аденозинтрифосфат
CoA	– кофермент А
FAD	– флаavin-аденин динуклеотид
FMN	– флаavinмононуклеотид
GTP	– гуанозинтрифосфат
NAD <sup>+</sup>	– никотинамид-аденин динуклеотид (окисленный)
NADH	– никотинамид-аденин динуклеотид (восстановленный)
NAD(P) <sup>+</sup>	– никотинамид-аденин динуклеотид фосфат (окисленный)
NAD(P)H	– никотинамид-аденин динуклеотид фосфат (восстановленный)
PEP	– фосфоенолпироват
P <sub>H</sub>	– неорганический ортофосфат
P <sub>HH</sub>	– неорганический пирогосфат
UTP	– уридинтрифосфат

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Данное учебное пособие посвящено рассмотрению основ *динамической биохимии*, т.е. тому ее разделу, который изучает всю совокупность химических превращений органических соединений в процессе жизнедеятельности. В связи с такой специализацией авторы почти не затрагивают проблемы *статической биохимии*, т.е. проблемы строения природных органических веществ и их биосинтеза, отсылая интересующихся к полным курсам биохимии.

При написании этого пособия авторы не ставили и не могли ставить задачу в какой бы то ни было мере дублировать существующие в настоящее время прекрасные многотомные учебники по биохимии и молекулярной биологии, многие из которых переведены на русский язык. Поэтому для изложения были выбраны те разделы биохимии, которые, по мнению авторов, необходимы для формирования биохимического мышления у читателей, главным образом студентов и аспирантов химических и микробиологических вузов, особенно специализирующихся в области экологии и биотехнологии. Этим, в частности, объясняется большой удельный вес материалов и примеров из области биохимии микроорганизмов, играющих основную роль в биотехнологических процессах.

Немаловажным фактором при выборе материала и, особенно, степени детализации его изложения послужили представления авторов о том, в каких разделах биохимии они считают себя наиболее компетентными.

Материалом для данного учебника послужили, в частности, лекции по общей биохимии и энзимологии, которые один из авторов длительное время читал в Московском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева и на биологическом факультете Московского государственного университета, где имел возможность контролировать усвояемость материала и вносить в текст лекций необходимые улучшения и дополнения.

# ВВЕДЕНИЕ

## ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Предметом биохимии являются *живые системы*. Задача этой науки, как следует из ее названия, — изучение *химических основ жизни*, т.е. химического состава и структуры компонентов живых систем, а также природы протекающих в них химических реакций. Главная цель — выяснение взаимосвязи молекулярной структуры и биологической функции, а не простое описание химических процессов в живых системах.

Очевидно, что *предмет* биохимии является общим с рядом других химических и биологических наук (биоорганической химией, молекулярной биологией, физиологией и т.д.), изучающих живые системы, тогда как *задачи* перекрываются лишь частично. Границы между этими науками в настоящее время в некоторых областях достаточно условны, и эта условность усиливается применением общих методов исследования (например, методов генетической инженерии). Биохимия составляет *фундамент* этих наук.

## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ЗНАНИЙ

Развитие биохимии было бы невозможно без открытия главных законов природы для неживых систем и изучения фундаментальных основ физики и химии этих систем. В конце XVIII в. А. Лавуазье и П. Лаплас показали, что основные законы сохранения вещества и энергии справедливы и для биологических объектов. Выделение большого количества новых индивидуальных веществ из живых организмов и установление того факта, что все они содержат углерод, положило на-

чало *органической химии*, основателем которой можно считать Ж. Гей-Люссака, изучившего методом сжигания состав многих углеводов и белков.

В 1824 г. Ф. Вёлер синтезировал шавелевую кислоту, а в 1828 г. мочевины, опровергнув виталистическую точку зрения, что органические вещества могут быть продуктом только живых организмов. Правда, Ф. Хеннель синтезировал этанол раньше, чем Ф. Вёлер шавелевую кислоту и мочевины, однако образующие этанол дрожжи до работ Л. Пастера не считались живыми организмами.

В XIX в. И. Берцелиус впервые использовал термин *катализатор* и сформулировал основные принципы катализа, после чего стало ясно, что птиалин слюны, пепсин желудочного сока и амилаза солода являются биологическими катализаторами.

К концу XIX в. были достигнуты большие успехи в развитии неорганической, органической и физической химии, сформулированы законы термодинамики, генетические принципы наследственности (Г. Мендель) и получила признание доктрина эволюции (Ч. Дарвин). В начале XX в. Э. Фишер разработал методы выделения мономеров из белков и полисахаридов, установил структуру и оптические конфигурации многих из них, продемонстрировал специфичность действия ферментов и, таким образом, положил начало многим направлениям биохимии. Сам термин *биохимия* был введен в 1903 г. К. Нейбергом. Однако в первой половине XX в. биохимики уделяли основное внимание малым молекулам (мономерам) и *составу* биополимеров, а *функционирование* биополимеров стало предметом интенсивного изучения лишь в середине и второй половине XX в.

В 70-е годы XIX в. К.Кюне был введен термин *энзим* (от *en zyme* — в закваске) для обозначения компонентов дрожжевой клетки, осуществляющих химические превращения субстратов. *Ферментами* в то время называли живые микроорганизмы. Однако в русскоязычной научной литературе в настоящее время для обозначения белковых катализаторов в основном употребляется термин «фермент».

Окончательно вопрос о том, что химические превращения субстратов катализируются определенными веществами, которые могут функционировать как внутри клеток («организованные» ферменты Л. Пастера), так и вне клеток («неорганизован-

ные» ферменты Ю. Либиха и К. Бернара), был решен в 1897 г. Г. и Э. Бухнерами, осуществившими процесс брожения с помощью экстракта из клеток дрожжей.

Широкое изучение физико-химических свойств ферментов и механизма их функционирования стало возможным только после разработки методов их получения в гомогенном состоянии. Первый индивидуальный кристаллический фермент (уреаза) получен Д. Самнером в 1926 г. Последующее выделение в индивидуальном состоянии ряда других ферментов привело к формулировке правила: «все ферменты – белки», которое было опровергнуто только в 70-е годы XX в. в результате открытия ферментативных свойств РНК (например, РНКазы Р, участвующей в процессинге *t*РНК) и ДНК. Такие ферменты получили название *рибозимы* и *ДНКзимы*, соответственно.

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

## **Принципы классификации семейства БИОХИМИЧЕСКИХ НАУК**

Основным принципом является классификация по *объекту* исследования, в результате чего выделяют следующие виды биохимии: *животных, растений и микроорганизмов*. В свою очередь, каждая из этих наук может быть подвергнута более подробному подразделению, например на биохимии *насекомых, водорослей, грибов* и т.д. Иногда объектом могут быть определенные классы химических соединений, например, биохимия *белков*, биохимия *целлюлозы* и др.

В качестве принципа классификации может также применяться наименование области применения биохимических подходов (с появлением, например, термина *техническая биохимия*). Наконец, при классификации иногда подчеркивается тот или иной аспект проблемы, включаемый в сферу действия данной области науки. Это приводит к появлению таких «гибридов», как *физическая биохимия*. Не вдаваясь в терминологическую казуистику, мы лишь констатируем сложившуюся ситуацию, выражающуюся, в частности, в существовании монографической литературы с указанными названиями.

В свою очередь, биохимия включается в более широкие понятия, например такое, как *физико-химическая биология*, объединяющее родственные физические, химические и биохимические разделы соответствующих наук: физики, химии и биологии.

## **ЗНАЧЕНИЕ БИОХИМИИ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ**

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

В последнее время появилось новое направление (а точнее, новый термин), включающее практически весь комплекс технических и естественных наук — *нанотехнология*. Нанотехнологические подходы используются в науке очень давно. Ведь любой фермент — это нанокатализатор. Новое развитие указанного направления связано с совершенствованием молекулярно-биологических и технологических методов и может обеспечить значительный прогресс во многих областях биотехнологии. Однако, подобно методам генетической инженерии, оно требует и тщательного анализа безопасности используемых приемов.

# Глава 1

## СТАТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ КЛЕТКИ

### 1.1. СТРОЕНИЕ И СОСТАВ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

#### 1.1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Все живые организмы состоят из клеток (о *вирусах* см. далее) и подразделяются на *одноклеточные* и *многоклеточные*. Популяция одноклеточных организмов включает клетки одного типа или близких типов, тогда как у многоклеточных организмов клетки специализированы и входят в состав *тканей*.

По типу строения клетки могут быть *прокариотическими* (от *pro* – до и *карион* – ядро, т.е. доядерные) и *эукариотическими* (от *eu* – истинный, т.е. настоящие ядерные). Прокариотические клетки не содержат оформленного ядра (генетический материал не отделен мембраной от внутреннего содержимого клетки), а также и многих внутриклеточных органелл: митохондрий, хлоропластов и др.

Все клеточные организмы имеют сходный химический состав и содержат три основных типа макромолекул: *ДНК*, *РНК* и *белки*, а также *полисахаридные* и *липидные* компоненты. Кроме того, в клетках присутствуют переменные количества субстратов и продуктов энергетических и конструктивных процессов (аминокислот, сахаров, нуклеотидов и др.), формирующих внутриклеточный резерв, или пул (от англ. *pool*), низкомолекулярных веществ. В среднем около 80% клеточной массы составляет вода.

Схемы строения прокариотической и эукариотических клеток представлены на рис. 1.1 и 1.2.

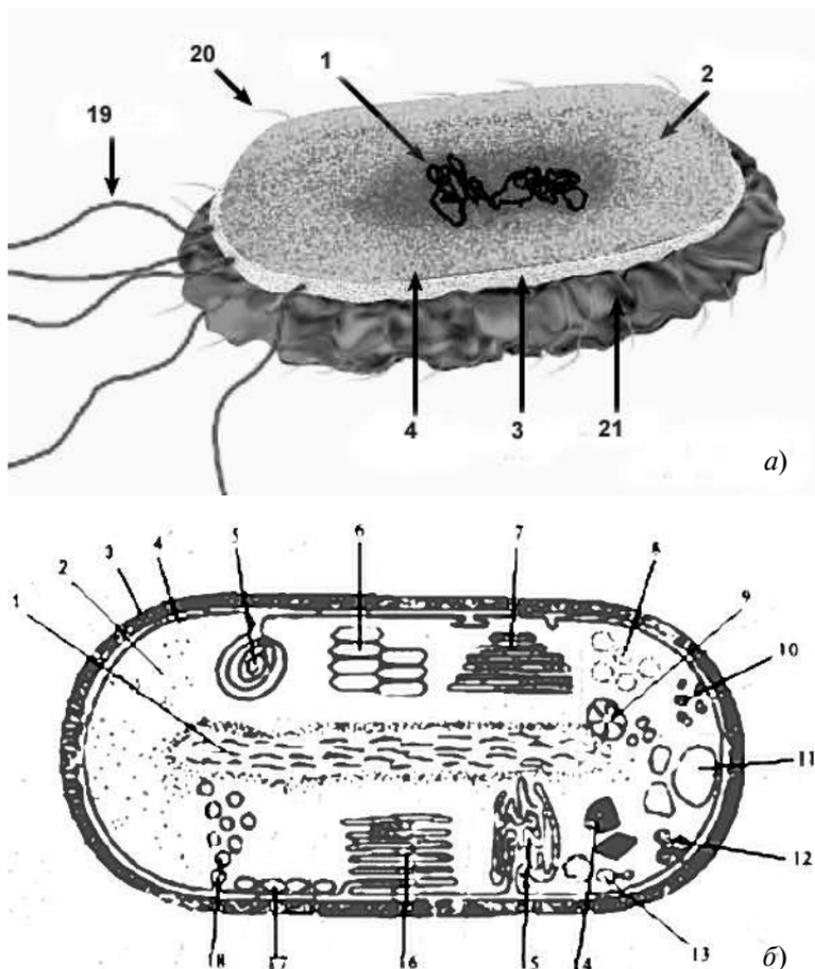


Рис. 1.1. Строение типичной прокариотической клетки<sup>1</sup>:

*а* – общий вид; *б* – внутреннее строение

1 – нуклеоид; 2 – рибосомы; 3 – клеточная стенка; 4 – цитоплазматическая мембрана; 5 – мезосома; 6 – газовые везикулы (аэросомы); 7 – внутрицитоплазматические ламелярные структуры; 8 – полисахариды; 9 – цианофициновые гранулы; 10 – полифосфаты; 11 – поли-β-оксимасляная кислота; 12 – жиры; 13 – сера; 14 – карбоксисомы; 15 – трубчатые тилакоиды; 16 – пластинчатые тилакоиды; 17 – хлоросомы; 18 – базальные тела; 19 – жгутики; 20 – пили; 21 – капсула

<sup>1</sup> Рисунок 1.1, *а* взят из Интернета ([www.cellsalive.com](http://www.cellsalive.com)), рис. 1.1, *б* из [2].

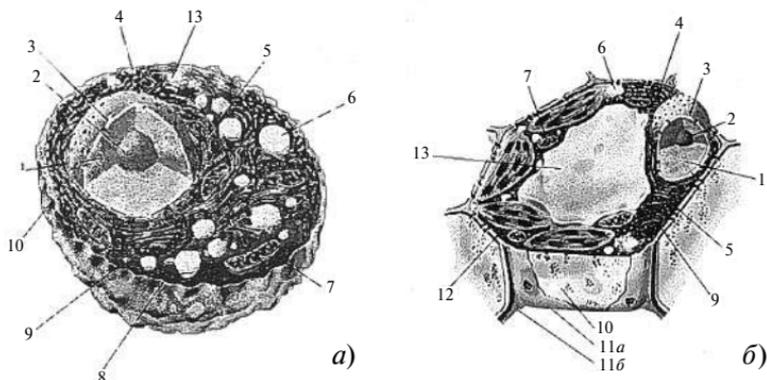


Рис. 1.2. Строение эукариотических клеток:  
*a* – животные; *б* – растения:

1 – ядро; 2 – ядрышко; 3 – ядерная мембрана; 4 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 5 – шероховатый эндоплазматический ретикулум; 6 – лизосома; 7 – митохондрия; 8 – микротрубочки; 9 – аппарат Гольджи; 10 – цитоплазматическая мембрана; 11 – клеточная стенка (11*a* – целлюлоза, 11*б* – пектин); 12 – хлоропласт; 13 – вакуоль [22]

Размеры и массы клеток разных организмов в сравнении с размером и массой органических молекул приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

### Размеры молекул по сравнению с размером клеток

Молекула или клетка	Размер (по длине), нм	Масса	
		дальтоны	граммы
Вода	0,3	18	$3 \cdot 10^{-11}$
Аланин	0,5	89	$15 \cdot 10^{-11}$
Глюкоза	0,7	180	$30 \cdot 10^{-11}$
Рибонуклеаза	3,5	750	$125 \cdot 10^{-11}$
Мембрана прокариот (толщина)	10		
Миозин	160	$47 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^{-7}$
Рибосома (70S)	18	$252 \cdot 10^4$	$42 \cdot 10^{-7}$
Бактериофаг (fx174)	25	$470 \cdot 10^4$	$78 \cdot 10^{-7}$
Вирус мозаики табака	300	$400 \cdot 10^5$	$66,7 \cdot 10^{-6}$
Митохондрия печени	1500		$6,68 \cdot 10^{-6}$
Клетки прокариот	250–250000		0,5–100
Клетка <i>Chlorella</i>	10000		10
Хлоропласт растений	8000		60
Клетка печени	20000		8000

### 1.1.2. КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

Как правило, клетки окружены двумя оболочками: *клеточной стенкой* и *цитоплазматической мембраной*, которую в случае эукариотических клеток принято называть *плазмалеммой*.

Клеточная стенка обеспечивает механическую прочность клетки, придавая ей жесткую (ригидную) структуру. Благодаря этой структуре клетка выдерживает высокое внутреннее осмотическое давление (5–20 МПа). Кроме того, клеточная стенка может обуславливать некоторую степень избирательной проницаемости для низкомолекулярных веществ, а также способность взаимодействовать с другими клетками, вирусами и физическими поверхностями. Строение клеточной стенки у разных организмов обнаруживает существенные особенности.

Клетки большинства тканей многоклеточных животных не содержат выраженной стенки. Напротив, стенка *растительных клеток* очень сложная; она построена из целлюлозных микрофибрилл, погруженных в матрикс (из пектина и гемицеллюлоз).

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

Клеточные стенки бактерий характеризуются способностью последних окрашиваться по Граму. У грамположительных бактерий клеточная стенка построена в основном из гетерополисахарида муреина (пептидогликана), содержащего аминокислотные «мостики». Кроме того, в ее состав входят также тейхоевые кислоты (рибит- или глицеринтейхоевые), ковалентно связанные с мурамовой кислотой пептидогликана. У грамотрицательных бактерий слой муреина невелик, но в клеточной стенке присутствует наружная мембрана, построенная из фосфолипидов, белков и липополисахарида, обеспечивающая некоторую степень избирательной проницаемости (за счет белков-поринов) и содержащая рецепторы фагов и антигены. Толщина стенки составляет 15–80 нм.

Существуют бактерии, полностью лишённые клеточной стенки, микоплазмы. У представителей *архебактерий* (*архей*) в клеточной стенке отсутствует муреин (иногда содержится отличающийся по составу псевдомуреин), а осмопротекторную роль выполняет слой *гликопротеинов* (*S-белков*).

Схема строения клеточной стенки у разных бактерий представлена на рис. 1.3.

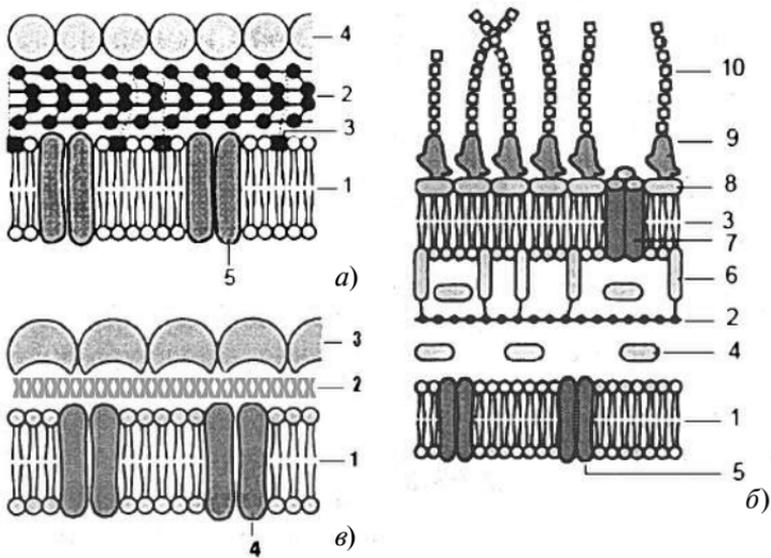


Рис. 1.3. Структура клеточной стенки различных прокариот:

*а* – грамположительные бактерии (1 – цитоплазматическая мембрана, 2 – пептидогликан (муреин), 3 – липотейхоевые кислоты, 4 – поверхностный слой S-белков (не у всех представителей));

*б* – грамотрицательные бактерии (1 – цитоплазматическая мембрана, 2 – пептидогликан (муреин), 3 – наружная мембрана, 4 – периплазматическое пространство, 5 – трансмембранные белки, 6 – липопотеины, 7 – белки-порины (строение липополисахарида), 8 – липид А, 9 – полисахаридная часть, 10 – антигенная (О – специфическая) часть);

*в* – археи (1 – цитоплазматическая мембрана (у некоторых представителей непрерывная), 2 – псевдомуреин (не у всех представителей), 3 – поверхностный слой S-белков, 4 – трансмембранные белки) [2]

*Цитоплазматическая мембрана*, кроме чисто механического отделения внутриклеточного содержимого от окружающей среды, участвует во множестве жизненных функций клетки. Содержащиеся в ней белки осуществляют транспортные функции (см. ниже). Локализованные в цитоплазматической мембране (у прокариот), а также в мембранах митохондрий и хлоропластов (у эукариот) метаболические системы обеспе-

чивают клетку энергией (дыхательный и фотосинтетический аппараты). С цитоплазматической мембраной прокариот связан аппарат репликации ДНК, который у эукариот локализован в ядре. В мембране расположено также устройство, обеспечивающее движение клеток (работу жгутиков, ворсинок и т.д.). Наконец, мембрана является акцептором и преобразователем химических и физических сигналов, поступающих из внешней среды.

Цитоплазматическая мембрана состоит из белков и липидов в соотношении от 1 : 4 (в миелине мембран нервных волокон) до 4 : 1 (в мембранах бактерий). Во многих мембранах присутствуют небольшие количества углеводов (до 5%) и следы РНК, а также неорганические катионы (в основном  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ). Мембрана обладает одновременно свойствами как супрамолекулярного комплекса, так и органеллы. Связь между белковыми и липидными компонентами мембраны является нековалентной. Существенную часть мембран составляет вода, участвующая в формировании *гидрофобных* (энтропийных) связей между компонентами мембраны. Эти связи обусловлены тем, что молекулы воды предпочтительнее взаимодействуют друг с другом, чем с неполярными частями белков и липидов, причем пространственные препятствия для такого взаимодействия, создаваемые неполярными молекулами, снижаются, если последние переходят из водной фазы, где они находятся в дисперсном виде, в агрегированное состояние, формируя мембранную структуру.

Таким образом, гидрофобные взаимодействия чрезвычайно важны для формирования («самосборки») и стабилизации структуры мембран. Эти взаимодействия нарушаются в присутствии поверхностно-активных веществ (детергентов) и некоторых растворителей.

Еще в 1930 г. *Д. Даниэлли* предложил модель мембраны в виде двойного липидного слоя, или *бислоя*. Развитием этих представлений является *жидкостно-мозаичная модель*, предложенная *С.Д. Сингером* и *Г. Николсоном* в 1972 г. (рис. 1.4).

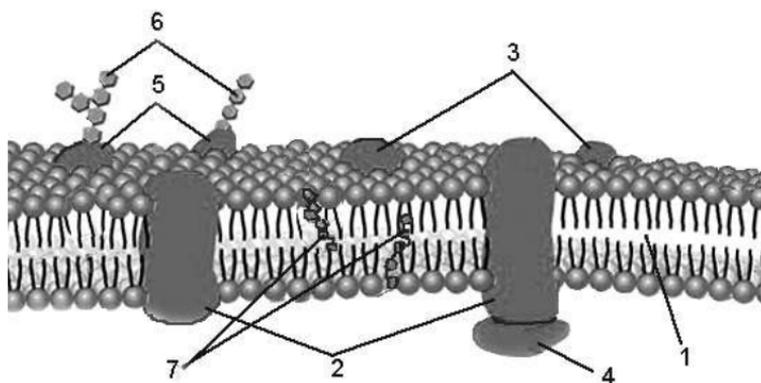


Рис. 1.4. Упрощенная схема жидкотно-мозаичной модели цитоплазматической мембраны:

1 — двойной слой фосфолипидов; 2 — интегральные трансмембранные белки; 3 — интегральные «плавающие» белки; 4 — периферический белок; 5 — гликопротеины; 6 — углеводные цепи; 7 — стеринны

*Мембранные белки*, согласно этой модели, подразделяются на две основные группы: *периферические*, слабо связанные с мембраной, и *интегральные*, содержащиеся в липидном бислое. Первые взаимодействуют со вторыми посредством электростатических или водородных связей. Мембраны оказываются асимметричными в отношении белкового состава, причем не только в поперечном направлении, но и в продольном (латеральном).

В дальнейшем эта классификация была дополнена и усовершенствована. Оказалось, что интегральные белки, в свою очередь, можно подразделить на ряд классов. Часть таких белков имеет глобулярную структуру и «плавает» в мембране, взаимодействуя с наружной водной фазой лишь ограниченными участками поверхности. К ним, например, относятся некоторые переносчики мембранных транспортных систем (см. разд. 3.7). Другая часть белков «заякорена» (*anchored*) в мембране лишь с помощью небольшого гидрофобного участка, а остальные белки локализованы в водной фазе по обе сто-

роны мембраны. К подобным белкам относятся, в частности, компоненты иммунной системы — рецепторы внеклеточных молекул, а также центры «узнавания», позволяющие клеткам отличать родственные им клетки от чужеродных и вирусов. Функции этих белков, как правило, определяются экстремембранной частью молекулы.

Наконец, существуют интегральные белки зигзагообразной формы, многократно пересекающие мембрану. Широко известный пример такого белка — *бактериородопсин*, участвующий в безхлорофильном фотосинтезе у экстремально галофильных архей (см. разд. 3.4) и содержащий семь трансмембранных сегментов.

Этот же тип локализации характерен и для некоторых АТФаз, способных к транслокации одновалентных катионов. Примером может служить  $K^+Na^+$ -АТФазы, содержащая десять трансмембранных сегментов. Некоторые транспортные переносчики также обладают множественными трансмембранными сегментами.

К интегральным относятся и *белки-порины*, локализованные в наружной мембране грамотрицательных бактерий. Типичный пример — *мальтопорин* (белок *LamB*). Это тримерный белок, формирующий поры диаметром около 5 Å, каждая из субъединиц которого имеет конфигурацию плоского листочка. Через эти поры проникают мальтоза и мальтодекстрины. Кроме того, мальтопорин является рецептором фага λ.

К белкам, формирующим ионные каналы, относятся также δ-эндотоксины, образуемые *Bacillus thuringiensis*. Эти белки связываются с мембранами клеток пищеварительной системы некоторых насекомых и вызывают их гибель путем повышения проницаемости мембран для одновалентных катионов.

Некоторые из интегральных белков могут ковалентно (но обратимо) связываться с липидами мембраны, т.е. «якорем» в мембране для таких белков являются липидные молекулы. Такое обратимое связывание позволяет изменять сродство белка к мембране и играет важную роль в контроле передачи регуляторных сигналов.

Мембранные липиды также обнаруживают пространственную асимметрию — например, входящий в состав некоторых мембран фосфатидилхолин неравномерно распределен между монослоями: в мембранах эритроцитов 76% его локализовано во внешнем монослое и 24% — во внутреннем. Асимметричное распределение фосфолипидов ускоряется в мембранах специальными белками — флипазами, с трансмембранной ориентацией, активность которых может быть АТР-зависимой (например, в эритроцитах). *Флипаза* транспортирует липид из внешнего липидного слоя во внутренний, а *флопаза* — в противоположном направлении.

Состав мембранных липидов многообразен. Основная их часть представлена фосфолипидами, в основе которых лежит глицерин-3-фосфат. Такие фосфолипиды называют фосфоацилглицеринами. В их молекуле гидроксильные группы глицерина при  $C_1$  и  $C_2$  этерифицированы жирными кислотами, а остаток фосфорной кислоты либо остается свободным, как в *диацилглицерин-3-фосфате* (или *фосфатидной кислоте*), либо этерифицирован спиртовыми гидроксилами серина, этаноламина, холина, инозита, глицерина или глицерина и лизина. Отсюда соответственно произошли их названия: фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин (кефалин), фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин, лизил-фосфатидилглицерин. При объединении молекул фосфатидной кислоты с фосфатидилглицерином образуется дифосфатидилглицерин (кардиолипин), обладающий иммуногенными свойствами. Эти взаимоотношения показаны на рис. 1.5.

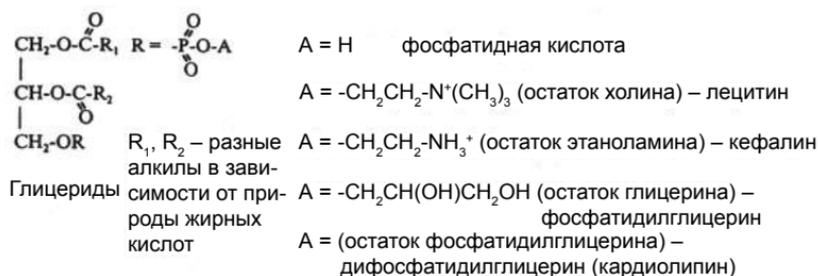


Рис. 1.5. Химическая структура мембранных фосфолипидов

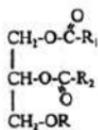
Мембраны грамположительных бактерий содержат все фосфолипиды (кроме лецитина), тогда как у грамотрицательных бактерий основным, а иногда единственным мембранным фосфолипидом является фосфатидилэтаноламин.

Удаление одной из ацильных групп приводит к образованию *лизофосфолипидов*, которые обладают выраженными поверхностно-активными свойствами и могут, например, способствовать эмульгированию жиров в кишечнике (*лизолецитин*). Однако образование лизолецитина в мембране под действием яда некоторых змей (например, кобры), содержащего фосфолипазу  $A_2$ , приводит к лизису клеток и может вызвать смерть укушенного животного.

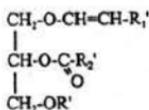
Замена ацильной группы при С-2 глицерина на ацетильную приводит к образованию *фактора активации тромбоцитов* (platelet activating factor – PAF), который значительно более растворим в воде, чем другие липиды, и функционирует как переносчик регуляторных сигналов, в частности при воспалении, аллергических реакциях и шоковых состояниях.

Соотношение различных классов фосфолипидов в мембране сильно зависит от условий выращивания организма. Например, при снижении рН среды в мембранах бактерий начинают преобладать положительно заряженные фосфолипиды (аминоацилфосфатидилглицерины, фосфатидилэтаноламин), наличие которых существенно уменьшает проницаемость мембраны для протонов.

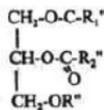
Как уже отмечалось выше, в большинстве случаев фосфолипиды представляют собой *сложные эфиры* глицерина или других многоатомных спиртов *sn*-1,2-конфигурации. Однако существуют липиды, в которых одна из спиртовых групп глицерина образует простую эфирную связь с алкилами или алкенами. Необычные липиды найдены у большой группы прокариот – так называемый *архебактерий* (или *архей*), где они являются простыми эфирами глицерина (*sn*-2,3-конфигурации) и длинноцепочечных С-20, С-40-гидроизопреноидных спиртов (полипренолов), а именно дифитанилдиглицериновыми диэфирами или дибифитанилдиглицериновыми тетраэфирами. Примеры этих соединений приведены на рис. 1.6.



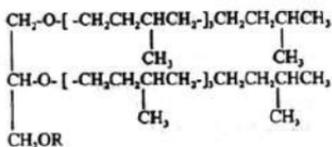
Глицериды



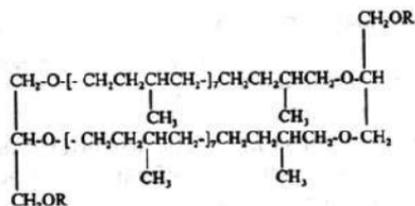
1-алкенилглицериновые эфиры (плазмалогены) (нервная ткань, моллюски, анаэробные бактерии)



1-алкилглицериновые эфиры (рыбы)



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



Тетраэфир (архебактерии: термоацидофилы, метаногены)

Рис. 1.6. Химическая структура фосфолипидов, содержащих простые эфирные связи, в сравнении со сложноэфирными глицеридами

Мембрана, образованная тетраэфирами, уже не может рассматриваться как двойной липидный слой в истинном значении этого понятия и не подвергается расщеплению по гидрофобной сердцевине методом «замораживания — скалывания» (*freeze — fracture*). Такая мембрана более устойчива к стрессовым воздействиям окружающей среды, что облегчает микроорганизмам (экстремофилам), имеющим такие мембраны, существование в условиях экстремальных pH и температур. У термофилов дополнительная стабилизация достигается формированием в полипренольной цепи пятичленных циклов, уменьшающих вращательную подвижность углеводородных цепей.

Кроме фосфолипидов, построенных на основе глицерина, в клетках эу- и прокариот встречаются фосфолипиды, которые являются производными диолов: этиленгликоля,

1,2- и 1,3-пропандиолов, 1,3-, 1,4- и 2,3-бутандиолов, а также 1,5-пентандиола. Среди диольных липидов встречаются моно- и диацильные производные, представляющие собой сложные эфиры различных жирных кислот, и простые эфиры, смешанные алкильные (или алкенильные) и ацильные производные, диольные аналоги фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др. Обычно содержание диольных липидов составляет только 0,5–1,5% от содержания глицериновых липидов, однако некоторые морские моллюски и иглокожие содержат примерно равные количества производных глицерина и этиленгликоля. Содержание диольных липидов уменьшается в течение зимы, поэтому предполагается, что они могут использоваться как запасные вещества. Их количество также повышается в процессе регенерации печени у крыс.

Другим классом «безглицериновых» липидов являются *сфинголипиды*, основу которых составляет алифатический аминоспирт *сфингозин*, или *дигидросфингозин* (рис. 1.7).

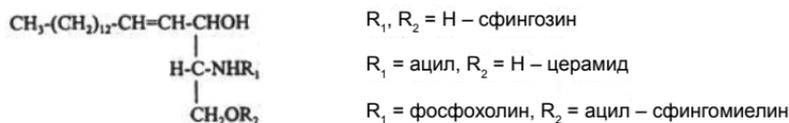


Рис. 1.7. Химическая структура сфинголипидов

Построенные на его основе *церамиды*, в которых жирные кислоты присоединены к сфингозину амидной связью, широко распространены в тканях растений и животных, но количество их незначительно. Они обнаружены также в *пилях Escherichia coli*. *Сфингомиелины* входят в состав нервной ткани, липидов крови и некоторых других компонентов клеток животных.

В большинстве биологических мембран содержатся также *гликолипиды*. В клетках животных они, как правило, представляют собой производные сфингозина, у которого к первичному гидроксилу присоединен остаток моно- или олигосахарида. Если сахарами являются глюкоза или галактоза, такие липиды называют *цереброзиды* (особенно много их в тканях мозга). Если углеводная часть – олигосахарид, речь идет о *ганглиозидах* (выделены из ганглий, мозга и ряда других тканей). Ганглиозиды найдены также в *пилях* некоторых бактерий (*Neisseria*) и определяют прилипание этих патогенов к поверхности клеток животного организма.

У прокариот (в основном у грамположительных бактерий и цианобактерий) гликолипиды также содержат глюкозу, галактозу и маннозу, количество которых в мембранах невелико, однако при лимитировании фосфором может возрастать. Гликолипиды при этом, по-видимому, замещают фосфолипиды.

Наконец, в мембранах большинства эукариот (а также у *Mycoplasma*) содержатся стероиды, в основном *холестерин* (у животных), *эргостерин* (у дрожжей) и *стигмастерин* (у растений). Микоплазмы не способны синтезировать стероиды, но требуют присутствия их в среде для стабилизации клеточной мембраны

Природа жирных кислот в липидах мембран зависит как от вида организма, так и от условий его существования. Большинство встречающихся в живых объектах жирных кислот имеют четное число атомов углерода (обычно от 14 до 24), однако некоторые морские организмы могут содержать жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов. Жирные кислоты могут быть *насыщенными* (не содержат двойных углерод-углеродных связей) или *ненасыщенными*. Если они содержат только одну двойную связь, их называют *мононенасыщенными*, если больше одной (не более четырех) — *полиненасыщенными*.

Двойные связи в жирных кислотах имеют цис-конфигурацию, что вызывает изгибание углеродной цепи и приводит к менее плотной упаковке липидов в липидном бислое. Таким образом, мембрана становится более «жидкой». Кроме того, с увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот (а также содержащих эти кислоты липидов) и повышается их растворимость в неполярных растворителях. Поскольку функциональная активность мембранных белков регулируется фазовым состоянием липидов мембраны (как правило, активность выше, когда липиды находятся в жидком состоянии), при *снижении температуры* в мембране должно *повышаться содержание ненасыщенных кислот*. Благодаря постоянству внутренних условий (гомеостазу) животного макроорганизма влияние температуры на жирнокислотный состав липидов проявляется слабо, хотя есть сведения, что, например, в липидах нижних конечностей пингвинов повышено содержание ненасыщенных жирных кислот.

Некоторые жирные кислоты не синтезируются в организме млекопитающих и должны поступать с пищей. К ним относятся *линолевая* и *линоленовая* кислоты. Одной из важных функций полиненасыщенных жирных кислот в организме животных является использование их в качестве предшественников *эйкозаноидов*, таких как *простагландины*, которые обладают гормоноподобным действием.

В мембранах прокариот разнообразие жирных кислот довольно велико. Особенностью бактерий является наличие *разветвленных* и *циклопропановых* кислот. У некоторых грамположительных бактерий (например, *Micrococcus luteus*) 90% жирных кислот липидов составляют разветвленные кислоты, а ненасыщенные кислоты практически отсутствуют. Грамотрицательные бактерии содержат смесь насыщенных и ненасыщенных кислот с преобладанием кислот С-16 и С-18, а также циклопропановые кислоты (например, *лактобацилловая кислота*). Пути их биосинтеза показаны на рис. 1.8.

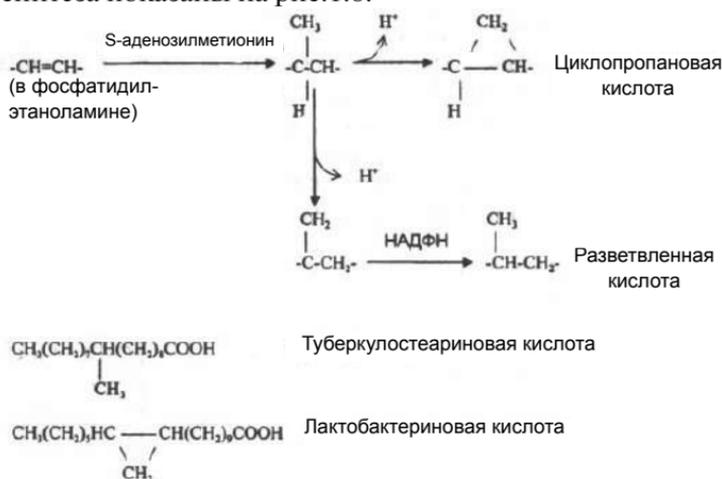


Рис. 1.8. Схема биосинтеза разветвленных и циклопропановых кислот

Как уже отмечалось выше, изменение температуры среды может влиять на соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембранах прокариот, при этом снижение температуры культивирования приводит к увеличению доли ненасыщенных кислот. Предельными случаями являются *психрофилы*, растущие при температурах, близких к  $0^\circ\text{C}$ , у которых присутствуют практически только ненасыщенные жирные кис-

лоты, а также *термофилы*, растущие выше 60°C, у которых, как правило, большинство жирных кислот липидов — насыщенные.

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

В табл. 1.2–1.4 приведены наиболее часто встречающиеся жирные кислоты липидов животных, растительных и прокариотных клеток.

### 1.1.3. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

Каждая живая клетка окружена полупроницаемой оболочкой, через которую свободно проходит вода, но которая является препятствием для большинства органических и неорганических веществ (о механизмах трансмембранного транспорта см. разд. 3.7). Поэтому между внутриклеточной средой и средой, окружающей клетку, создается градиент концентрации этих веществ, причем концентрация многих продуктов метаболизма, а также макромолекул внутри клетки обычно выше, чем в среде. Это вызывает поступление в клетку воды, которая «стремится» разбавить внутриклеточное содержимое. Самопроизвольный переход воды (растворителя) в раствор, отделенный от нее полупроницаемой мембраной, называют *осмосом*. Осмос обусловлен тем, что концентрация (термодинамическая активность) воды в единице объема окружающей клетку среды выше, чем внутри клетки (где вода частично связывается другими молекулами и ионами за счет их гидратации), а по термодинамическим законам система «среда — клетка» стремится к уравниванию концентрации воды. При поступлении воды в клетку повышается тургорное давление (набухание). Это могло бы вызвать разрыв клеточной мембраны, если бы отсутствовала клеточная стенка. Поэтому структурные образования, частично или полностью лишенные клеточной стенки (*протопласты, сферопласты, L-формы*), способны сохраняться только в присутствии веществ, снижающих активную концентрацию воды в среде (например, сахарозы).

В клетках грамотрицательных бактерий тургорное давление составляет 5–6 атм (0,5–0,6 МПа), тогда как в клетках грамположительных бактерий оно достигает 20 атм (2 МПа).

Таблица 1.2

### Природа жирных кислот в липидах клеток животных

Группа кислот	Конфигурация					
	С-16, пальмитиновая	С-18, стеариновая	С-20, арахиновая	С-22, бегеновая	С-24, лигноцериновая	С-12, 14 и С-26, 28 в следовых количествах
Насыщенные						
Мононенасыщенные	С-16, цис-пальмитиновая Как правило, цис-конфигурация С-16, пальмитолеиновая (цис-9-гексадеценовая)	С-18, олеиновая (цис-9-октадеценовая) С-18, вакценовая (11-октадеценовая) транс – у животных, цис – у бактерий	–	–	–	–
Полиненасыщенные	Как правило, дивинилметановая группировка	С-18, линолевая (цис, цис-9, 12-октадеценовая), С-18, линолевая (9, 12, 15-октадецатриеновая)	С-20, арахидовая (5, 8, 11, 14-эйкоза-тетраасеновая). Предшественник простагландинов, встречается также у грибов	–	–	–

Таблица 1.3

## Природа жирных кислот в липидах клеток растений

Группа кислот	Конфигурация		
	С-16, пальмитиновая	С-18, отсутствует	С-12, 14 и С-26, 28 в следовых количествах
Насыщенные			
Мононенасыщенные	—	С-18, рициноленовая (12-оксисис-9-октадеценевая), в касторовом масле С-18, крепининовая (с тройной связью) у сложноцветных	—
Полиненасыщенные	—	Как правило, с конъюгированными двойными связями С-18, элеостеариновая (сис-9, 11, 13-октадекатриеновая) С-18, линолевая и линолиновая	—

Таблица 1.4

## Природа жирных кислот в липидах клеток прокариот

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

Вероятно, эта особенность последних является следствием того, что ранние этапы их эволюции проходили в среде с большим высоким содержанием растворенных веществ. В животных клетках тургор не бывает высоким из-за отсутствия у них стенки (разность внутреннего и внешнего гидростатического давления не превышает 1 атм.). У большинства растений тургорное давление достигает 10 атм, а самое высокое оно у грибов – до 100 атм.

Поддержание определенного тургорного давления является жизненно необходимым свойством клетки, в частности, его величина определяет структуру ее стенки. У бактерий при снижении тургорного давления уменьшается степень поперечных сшивок в пептидогликане. Поэтому в клетке существует несколько механизмов для регулирования тургорного давления. Например, клетки *E. coli*, помещенные в среду с повышенным содержанием растворенных веществ, теряют воду, вследствие чего тургорное давление снижается. Для его поддержания активируется система поглощения ионов  $K^+$  (*TrkAЕH-система*), а если концентрация ионов  $K^+$  в среде низкая, то дополнительно индуцируется *Kdp-система*, обладающая более высоким сродством к ионам  $K^+$ .

Величина тургорного давления определяется разностью между осмотическим давлением внутри клетки и во внеклеточной среде. В свою очередь, *осмотическое давление*, по Вант-Гоффу, численно равно тому газовому давлению, которое имело бы растворенное вещество, если бы, находясь в газообразном состоянии, при той же температуре оно занимало объем, равный объему раствора. Таким образом, применяя уравнение состояния идеального газа, получаем:

$$\pi V = m RT,$$

где  $\pi$  – осмотическое давление;  $V$  – объем раствора;  $m$  – количество вещества, моль;  $T$  – абсолютная температура, К;  $R$  – универсальная газовая постоянная, равная  $0,082 \text{ л} \cdot \text{атм} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ .

Учитывая, что выражение  $m / V = C$ , т.е. молярной концентрации осмотически активных частиц, можно записать:

$$\pi = CRT.$$

Так как объем 1 моля (1М) газообразного вещества равен 22,4 л, то осмотическое давление 1 М раствора (моль/л) равно 22,4 атм (2,2 МПа).

Следует отметить, что все эти закономерности справедливы только для разбавленных растворов, в которых количество растворенного вещества невелико по сравнению с количеством растворителя.

Осмотическое давление является функцией общего числа растворенных в единице объема частиц (молекул или ионов) и не зависит от их природы. Растворимые соли диссоциируют в растворе на два или несколько ионов, так что их осмотическая концентрация в соответствующее число раз превышает молярную концентрацию. Поэтому осмотическую концентрацию иногда выражают не в молях, а в осмомолях (или осмолях) (Осм, Osm). Это особенно удобно в случае смеси солей; например, раствор с концентрацией  $100 \text{ мМ NaHCO}_3 + 50 \text{ мМ Na}_2\text{CO}_3$  будет иметь осмотическую концентрацию, равную  $100 \times 2 + 50 \times 3 = 350 \text{ мОсм}$ . Связанные ионы не создают осмотического давления.

Растворы, в которых осмотическое давление одинаково, называются *изотоническими*.

Доступность воды для живых организмов определяется *активностью воды* ( $a_w$ ), которая равна отношению давления пара раствора к давлению пара чистой воды. Осмотическое давление и активность воды связаны соотношением

$$\pi = (RT/V_w) \ln a_w,$$

где  $V_w$  — объем 1 моля воды.

Живые организмы способны существовать в диапазоне активности воды от 0,6 до 0,998. Для большинства организмов необходима активность воды, превышающая величину 0,98. Галофильные бактерии растут при активности воды, равной 0,75, а некоторые грибы — при 0,6–0,7.

#### 1.1.4. Вирусы и фаги

Вирусы и фаги не являются предметом рассмотрения в данной книге, поэтому ограничимся лишь их краткой характеристикой.

*Вирусы* — это супрамолекулярные комплексы, содержащие нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК), заключенные в белковый чехол.

Некоторые вирусы окружены мембраноподобной оболочкой (рис. 1.9).

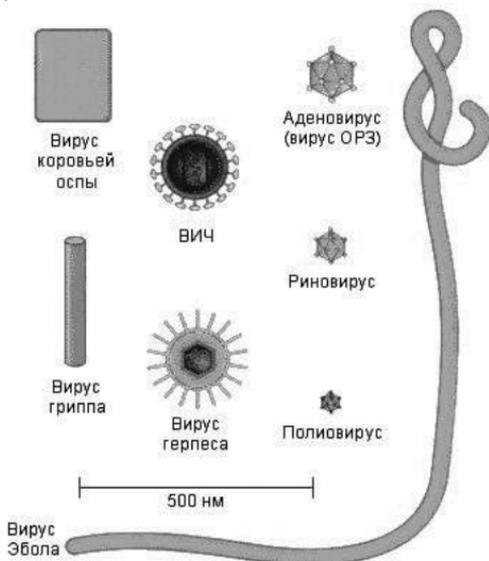


Рис. 1.9. Сравнение размеров и строения разных типов вирусов (см. источник <http://www.college.ru/biology/course/content/chapter1/section1/paragraph1/theory.html> с изменениями)

Термин «вирусы» является общим для описания подобных объектов, особенно когда хозяин вируса – животное или растение. Для вирусов бактерий чаще используют термин «бактериофаги» (или просто «фаги»).

Фактически вирусы представляют собой не живые организмы во всей полноте этого понятия, а разновидность мобильных элементов, несущих генетическую информацию. Белковая оболочка вирусов в основном выполняет защитную роль, а также функции узнавания специфического хозяина и средства доставки нуклеиновой кислоты, которая поступает внутрь клеток хозяина, обеспечивая воспроизведение вируса и лизис клеток. Таким образом, вирусы можно рассматривать как клеточные паразиты.

В некоторых случаях генетические элементы вирусов могут интегрироваться в хромосому хозяина и существовать там в скрытом состоянии, которое называют лизогенным. Некоторые вирусы вызывают трансформацию здоровых клеток с возникновением клеток опухоли, способных к нерегулируемому клеточному делению.

Вирусы часто служат удобным объектом молекулярно-генетических исследований, о чем подробнее будет сказано в разд. 4.1 и 4.2.

## 1.2. ПОНЯТИЕ О КОМПАРТМЕНТАЦИИ. ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ

Распределение веществ или процессов по внутриклеточным изолированным «отсекам» называют *компарментацией* (от англ. *compartment* – отсек). В клетках эукариот таких отсеков, изолированных внутриклеточными мембранами *органелл*, много, а у прокариот они встречаются сравнительно редко. Один из примеров – *периплазматическое пространство* между цитоплазматической и наружной мембранами у грамотрицательных бактерий (см. рис. 1.3).

Для изучения структуры, состава и функции органелл необходимо, как правило, изолировать их от клетки в чистом виде. Обычно это достигается методом *дифференциального центрифугирования* после разрушения клеток в механических или ультразвуковых *гомогенизаторах* (табл. 1.5).

Таблица 1.5

### Фракционирование гомогената животных клеток методом дифференциального центрифугирования

Фракция	Центробежное ускорение, тыс. $g^*$	Время центрифугирования, мин	Ферментативная активность в осадке
Обломки клеток, ядра	1 – 6	10	Синтез нуклеиновых кислот
Митохондрии лизосомы и др.	10 – 15	20	Энергетические процессы
Микросомы, вакуолярные компоненты, мембраны	50 – 100	120	Синтез белка
Растворимая фракция (супернатант)			Гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и др.

\*  $g$  – ускорение свободного падения.

Для более тонкого фракционирования внутриклеточных органелл используют центрифугирование в *градиенте плотности сахарозы*.

Охарактеризуем кратко основные внутриклеточные органеллы и структуры (в том порядке, в котором они расположены в табл. 1.6).

Таблица 1.6

### Основные различия между клетками прокариот и эукариот

Структура или компонент	Эукариоты		Прокариоты
	Животные	Растения	
Размер клеток	> 2 мкм	> 2 мкм	0,2–2 мкм
Ядро (нуклеоид)	+	+	–
Гистоны	+	+	±
Внеядерная ДНК: в органеллах в плазмидах	+	+	–
	–	±	+
Митохондрии	+	+	–
Хлоропласты	–	+	–
Аппарат Гольджи	+	+	–
Эндоплазматический ретикулум	+	+	–
Вакуоли	+	+	–
Газовые вакуоли (аэросомы)	–	–	±
Лизосомы	+	+	–
Микротрубочки и микрофиламенты	+	+	±
Микротельца: пероксисомы глиоксисомы гликосомы жгутики реснички карбокисомы гидрогеносомы целлюлосомы хитосомы (только у грибов)	+	+	–
	–	+	–
	+	–	+
	+	+	+
	+	±	–
	–	–	±
	±	–	–
	–	–	±
	–	–	–
	–	–	–
Пили, фимбрии, простеки	±	±	+

Продолжение табл. 1.6

Структура или компонент	Эукариоты		Прокариоты
	Животные	Растения	
Запасные вещества: поли-β-оксибутират крахмал	–	–	+
	–	+	–
Клеточная стенка: наличие целлюлозы наличие муреина наличие других гетерополисахаридов	–	+	–
	–	–	+
	±	+	–
Эндоспоры	–	–	+
Особенности размножения: митоз мейоз	+	+	(+)
	+	+	–
Молекулярно-биологические свойства: число хромосом хромосомы кольцевые хромосомы линейные рибосомы 70 S рибосомы 80 S	Обычно больше 1	Обычно больше 1	Обычно равно 1
	–	–	+
	+	+	–
	–	–	+
	+	+	–
Состав мембран: стеролы полиненасыщенные жирные кислоты разветвленные и циклопропановые жирные кислоты	+	+	±
	+	+	±
	±	±	+
Локализация дыхательной и фотосинтетической цепи: в цитоплазматической мембране и производных структурах	–	–	+
Особенности ферментов: супероксид дисмутаза Cu-Zn-типа супероксид дисмутаза Mn и/или Fe-типа	+	+	±
	–	–	+

Окончание табл. 1.6

Структура или компонент	Эукариоты		Прокариоты
	Животные	Растения	
Особенности метаболизма: хемолитоавтотрофный тип	–	+	±
фиксация азота	–	–	±
аноксигенный фотосинтез	–	–	±
метаногенез	–	–	±
диссимиляционное восстановление нитратов до закиси азота или азота	–	–	±
запасное вещество – поли-β-оксибутират	–	–	±
Чувствительность к антибиотикам: пенициллин, стрептомицин и другие, специфичные для прокариот	–	–	±
циклогексимид и другие, специфичные для эукариот	+	+	–

Различия в метаболических процессах будут описаны в последующих главах.

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

*Гистоны* – это положительно заряженные (основные) белки, входящие в состав хромосом в комплексе с ДНК (обнаружены также у археобактерий).

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

риот внехромосомная ДНК организована в виде *плазмид*, которые могут существовать и реплицироваться автономно или в интегрированном в хромосому состоянии.

*Митохондрии* являются местом, где осуществляются окислительные процессы. В них локализованы ферменты цикла трикарбоновых кислот, дыхательная цепь, система окислительного фосфорилирования. В клетках содержится от одной до нескольких тысяч митохондрий. Митохондрии содержат внехромосомную ДНК, способны к самовоспроизведению и, возможно, ведут свое начало от прокариотических клеток (*эндосимбиотическая гипотеза*). Однако часть белков этих органелл кодируется ядерными генами, поэтому они не культивируются автономно. У прокариот сходные по функциям структуры, которые происходят из цитоплазматической мембраны и участвуют в энергетическом метаболизме, называют *мезосомами*. Другой важной функцией мезосом является участие в делении бактериальной клетки.

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

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

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

*Газовые везикулы*, или *аэросомы* – однослойные везикулы, мембрана которых построена только из белка. Они способствуют повышению плавучести клеток, так как в них содержится газовая фаза, совпадающая по составу с газовой фазой окружающей среды.

*Лизосомы* – мембранные везикулы, содержащие гидролитические ферменты, участвующие в круговороте белков, полисахаридов, липидов и нуклеиновых кислот. Для предотвращения неорганизованного действия этих ферментов они заключены в органеллу, окруженную однослойной мембраной. Некоторые наследственные болезни связаны с недостаточностью лизосомных ферментов.

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

*Микротельца* – *пероксисомы* и *глиоксисомы*. *Пероксисомы* – органеллы, окруженные однослойной мембраной и содержащие ряд окислительных ферментов, а также каталазу, разрушающую перекись водорода, образующуюся в окислительных процессах. Они играют важную роль в обмене липидов. *Глиоксисомы* (разновидность пероксисом) – место локализации ферментов глиоксалатного шунта, участвующих в превращении запасных жиров в углеводы. Поэтому они тесно ассоциированы со *сферосомами* – жирозапасующими органеллами растительных клеток.

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

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

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

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

*Целлюлосомы* содержат комплекс ферментов и липидов, определяют присоединение бактерий к целлюлозным субстратам и их расщепление.

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

*Пили, фимбрии* представляют собой выросты поверхности клеток и бывают простые и половые. Пили построены из белка пилина и играют важную роль в прикреплении бактерий к субстрату. На поверхности клетки может быть 50–400 простых пилей. Половые пили (одна на клетку) используются в процессе конъюгации. Выросты клеток, содержащие цитоплазму, называют *протекками*. Они служат для увеличения поверхности клеток, прикрепления к субстрату или участвуют в почковании клеток.

*Запасные вещества: поли-бета-оксибутират* и его аналоги встречаются только у прокариот. В клетках животных и растений аналогичную роль выполняют *гликоген* (обнаружен и у некоторых прокариот) и *крахмал*. В клетках дрожжей и бактерий важную роль играют также *полифосфаты*.

*Митоз* – деление ядра, сопровождающееся удвоением числа хромосом. *Мейоз* – деление ядра без удвоения числа хромосом, в результате чего образуются *гаплоидные* клетки.

## Глава 2

# ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ

### 2.1. ФЕРМЕНТЫ – КАТАЛИЗАТОРЫ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

#### 2.1.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

Реакции, протекающие в живых организмах, подчиняются общим законам химии, однако отличаются высокой скоростью, а также специфичностью, которая исключает образование побочных продуктов. Такие реакции протекают в мягких «физиологических» условиях, а их скорость может регулироваться в широких пределах. Все эти особенности биохимических реакций определяются свойствами их (как правило) белковых посредников – ферментов, выполняющих роль катализаторов. Однако для понимания роли ферментов как *биологических катализаторов* необходимо остановиться на некоторых общих особенностях катализируемых химических реакций.

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

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

Определение понятия *катализатора* как вещества, *снижающего энергию активации*, неточно. На самом деле катализатор вступает во взаимодействие с реагирующими веществами и *направляет реакцию по новому пути с низкой энергией активации* (рис. 2.1).

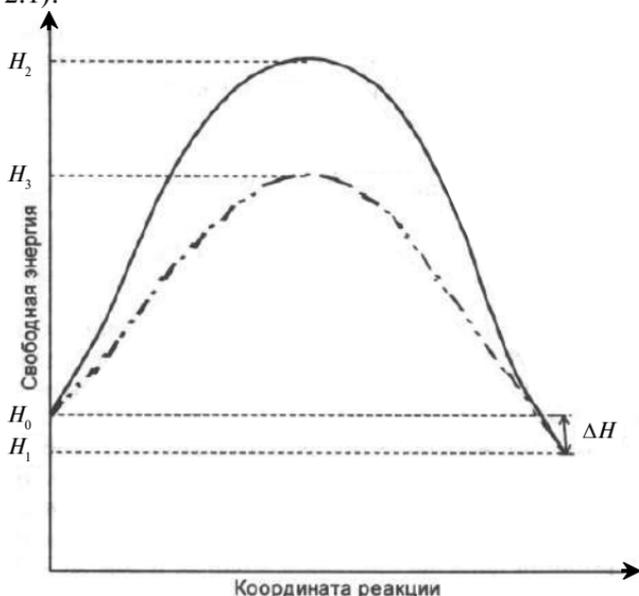


Рис.3.1. Диаграмма переходного состояния химической реакции:

$H_0$  – энтальпия (тепловая энергия) исходных субстратов;  $H_1$  – энтальпия продуктов реакции;  $H_2 - H_0$  – энергия активации некатализируемой реакции;  $H_3 - H_0$  – энергия активации катализируемой реакции;  $\Delta H = H_1 - H_0$  – тепловой эффект реакции: если  $\Delta H < 0$ , реакция экзергоническая (экзотермическая), т.е. протекает самопроизвольно с выделением тепла, если  $\Delta H > 0$ , то реакция эндэргоническая (эндотермическая), т.е. требует затраты энергии

Следует учитывать, что в энергии активации присутствует не только энтальпийная ( $\Delta H$ , тепловая) составляющая, но и энтропийная ( $\Delta S$ , мера упорядоченности системы). Высокая энтальпийная составляющая свидетельствует о том, что для формирования переходного состояния необходимо существенное ослабление химических связей. Для многих химических реакций механизм активации молекул, по-видимому, сходен, так как  $\Delta H$  для них практически совпадает и составляет около  $50 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ . Высокая энтропийная составляющая встреча-

ется реже и означает, что в процессе формирования переходного состояния молекулы должны принять строго определенную конформацию.

Таким образом, правильное определение понятия «катализатор» можно сформулировать следующим образом.

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

Следует напомнить, что катализатор только *ускоряет достижение равновесия* в химической реакции, но не изменяет его *положения* (т.е. соотношение субстрата и продуктов). Присутствие катализатора не вызывает термодинамически невозможную реакцию и не влияет на выход продуктов, поскольку катализатор не взаимодействует с продуктами реакции.

Некатализируемая реакция  $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} B$ ,  $K_p = \frac{[B]}{[A]}$ .

Катализируемая реакция  $A + \text{Cat} \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} X \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} B + \text{Cat}$ ,  $K_p = \frac{[B]}{[A]}$ ,  
где А – субстрат, В – продукт,  $K_p$  – константа равновесия.

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

### 2.1.2. СРАВНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО И ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Механизмы химического и ферментативного катализированных реакций принципиально не различаются. Однако при нормальных физиологических условиях (рН и температуре) в водных растворах фермен-

ты значительно более эффективны (*сильнее снижают свободную энергию переходного состояния*), чем обычные химические катализаторы. Кроме того, ферменты, как правило, катализируют *только один из возможных путей превращения* субстратов, тогда как в ходе обычных химических реакций образуется смесь продуктов.

Еще более существенным моментом является то, что ферменты обладают чрезвычайно высокой *стереоспецифичностью*, различая, например, оптические изомеры и даже изотопы одного и того же элемента. Это связано с особенностями структуры активных центров ферментов и конформационной «гибкостью» их молекул. Если Э. Фишер, разрабатывая теорию специфичности ферментов, рассматривал субстрат и фермент как «ключ и замок», то Д. Кошланд сформулировал концепцию *индуцированного соответствия*, согласно которой при связывании специфического субстрата происходит такое изменение конформации фермента, которое перемещает каталитические группы в положение, обеспечивающее эффективное протекание реакции. Кроме того, силы сорбции субстрата на ферменте обеспечивают деформацию молекул реагирующих компонентов, способствующую реакции.

В общем виде суть современных представлений о взаимодействии субстрата и фермента можно сформулировать следующим образом: *энергия связывания (сорбции) субстрата на ферменте обеспечивает понижение барьера свободной энергии активации протекающей химической реакции.*

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

Такие конформационные изменения могут быть вызваны веществом, не являющимся субстратом данного фермента. Отсюда становятся понятными факты стимулирующего (инги-

бирующего) влияния молекул, не участвующих непосредственно в ферментативной реакции. Например, *формиат* ускоряет перенос аминогруппы с *аланина* на *2-оксоглутарат* с участием *трансаминазы*, тогда как при использовании в качестве донора аминогруппы *глутамата* формиат оказывает отрицательное воздействие (рис.2.2).

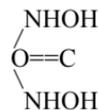
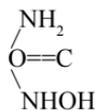
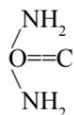


Рис. 2.2. Влияние формиата на активность трансаминазы

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

Насколько велика специфичность действия ферментов? Рассмотрим некоторые примеры.

1. Фермент *уреаза* обладает практически абсолютной специфичностью к своему субстрату *мочевине*: при замене только одного из атомов водорода в аминогруппе на *ОН* сохраняется лишь частичная активность:



Активный субстрат    Слабоактивный субстрат    Неактивный субстрат

2. Фермент *сукцинатдегидрогеназа* допускает замену только одного атома водорода в  $\text{CH}_2$ -группе на атом *Cl* (но не других галоидов или *ОН*).

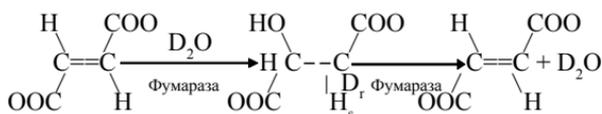
3. Встречается *групповая специфичность* ферментов, например в отношении стереоизомеров. Так, *оксидазы-D-аминокислот* малоспецифичны в отношении хими-

ческой природы аминокислоты, но не действуют на их L-изомеры.

Известны примеры необычайно высокой специфичности.

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

5. Некоторые ферменты обладают настолько высокой стереоспецифичностью, что могут «различать» две одинаковые группы в симметричной молекуле субстрата, а также каждый из атомов водорода, входящих в состав  $\text{CH}_2$ -группы. Например, реакция взаимопревращения малата и фумарата протекает таким образом, что отщепляется (или присоединяется) только атом H, находящийся в про-R-положении, тогда как атом H, находящийся в про-S-положении, не затрагивается.



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

### 2.1.3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

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

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

2. Субстраты также должны быть максимальной чистоты и не содержать других веществ, на которые действует данный фермент. Оптические изомеры нужно исследовать отдельно, так как присутствие одного из изомеров может влиять на пре-

вращение другого изомера (например, D-аспарагин конкурентно подавляет дезаминирование L-аспарагина, катализируемое аспарагиназой).

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

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

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



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

а) активности не должны разделяться разными методами фракционирования;

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

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

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

#### 2.1.4. ПРИРОДА ФЕРМЕНТОВ.

##### КОФЕРМЕНТЫ И ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ

Ферменты могут представлять собой *простые белки*, не содержащие других компонентов, кроме полипептидных цепей. Однако существуют также *сложные белки*, для проявления каталитической активности которых необходимы небелковые компоненты, называемые *коферментами*, или *простетическими группами*. Подразумевается, что коферменты в отличие от простетических групп более лабильно связаны с белковой частью фермента.

*Рибозимы и абзимы.* До сравнительно недавнего времени биохимики были уверены, что все ферменты представляют собой белки. Однако выявляется все больше примеров, когда каталитические функции осуществляют РНК, свободные от белка (а также ДНК). Такие РНК получили название *рибозимы* (ribozymes) по аналогии с понятием энзимы. Рибозимы обладают свойствами, характерными для белковых ферментов: они ускоряют химические реакции, освобождаясь в неизменном виде, а также обнаруживают субстратную специфичность. Первым примером рибозимов оказалась РНКазы Р, осуществляющая процесс «созревания» тРНК. Внутри клетки этот рибозим нуждается в активирующем действии белковой субъединицы, однако *in vitro* он активен и в отсутствие белка. Наиболее ярким примером является рибозимная активность 23S РНК в пептидилтрансферазной реакции в процессе трансляции. В последнее время получен синтетический олигонуклеотидный рибозим, содержащий 196 оснований, способный катализировать данную реакцию.

Тем не менее свойства рибозимов существенно отличаются от свойств белковых ферментов, поскольку первые зачастую эффективно катализируют только собственную трансформацию, как, например, в процессе сплайсинга (splicing) при созревании рибосомной РНК у *Tetrahymena*. Рибозимы, как правило, нуждаются в активирующем действии белковых компонентов. Тем не менее открытие рибозимов оказало существенную поддержку взглядам на первичную роль РНК (а не ДНК и белков) в биохимической эволюции.

Другим классом ферментов, детальное изучение которого началось сравнительно недавно, являются *абзимы* (abzymes, от англ. *antibody* и *enzymes* или *catmab* (от англ. *catalytic monoclonal*

*antibody*), представляющие собой антитела, обладающие каталитической активностью, использующие при катализе энергию сайт-специфического связывания с молекулой-мишенью.

Преимущество абзимов основывается на чрезвычайном разнообразии антител (главным образом, иммуноглобулинов), вырабатываемых иммунной системой, поскольку антитела «конструируются» из стандартной части молекулы и части, комплементарной антигену. Абзим должен быть комплементарен «переходному состоянию» катализируемой им реакции (см. разд. 3.1).

Наконец, в самое последнее время обнаружен еще один класс биологических катализаторов, представленный молекулами ДНК – ДНКзимы. Они катализируют сайт-специфичное расщепление РНК, в том числе определенных РНК-матриц, что может служить для защиты клетки от заражения вирусами.

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

При отсутствии заряженных групп у *гидрофильных* (полярных) субстратов (например, сахаров) взаимодействие их с ферментами должно быть обусловлено *водородными связями*. В случае незаряженных *гидрофобных* (неполярных) субстратов (например, содержащих углеводородные цепи) взаимодействие должно быть обусловлено *гидрофобными* (вандерваальсовыми) силами. Взаимодействие *металлоферментов* с субстратами может быть обусловлено образованием *координационных связей* между лигандными группами субстрата и атомом металла.

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

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

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

*КФ 1.1* – действуют на СНОН-группу доноров;

*КФ 1.1.1* – акцепторами служат  $\text{NAD}^+$  или  $\text{NADP}^+$ .

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



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



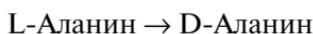
3. *Гидролазы*, катализирующие перенос групп на молекулу воды, например 3.1.2.1 *Ацетил-СоА-гидролаза*:



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



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



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



Несмотря на общепринятые требования к обозначению названий ферментов в научной литературе в соответствии с международной классификацией, нередко встречаются также *рабочие* названия ферментов, которые складываются из названия субстрата, типа реакции и окончания «-аза». Например, фермент КФ 1.1.1.1 алкоголь: NAD оксидоредуктазу называют просто *алкогольдегидрогеназа*.

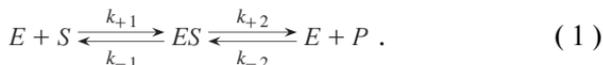
## 2.2. КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

### 2.2.1. ОСНОВНЫЕ УРАВНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Кинетические исследования ферментативных реакций необходимы не только для количественного определения ферментов и сравнения скоростей их функционирования, но в еще большей степени для расшифровки механизмов ферментативных реакций. В этих целях, прежде всего, необходимо уметь корректно вычислять кинетические параметры ферментативных реакций, оценивать конкурентный или неконкурентный характер действия ингибиторов. Рассмотрим основные уравнения, описывающие ферментативную кинетику и способы вычислений. Основное внимание будем уделять не строгости математического вывода уравнений (что, на самом деле, невозможно по вполне объективным причинам, как будет ясно из дальнейшего изложения), а правильному их использованию для получения достоверных результатов.

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

1. Фермент ( $E$ ) и субстрат ( $S$ ) образуют фермент-субстратный комплекс ( $ES$ ) за счет сил физической природы. Из этого комплекса в дальнейшем освобождаются фермент и продукт ( $P$ ). Таким образом, химической реакцией является только второй этап – распад фермент-субстратного комплекса:



2. Концентрация субстрата обычно значительно выше концентрации фермента. Поэтому при рассмотрении начальных скоростей реакции, когда концентрация продукта очень низка ( $[P] = 0$ ), обратимостью второй стадии можно пренебречь.

Следовательно,  $[ES] = \text{const}$ , а скорость образования продукта (по уравнению реакции первого порядка)

$$V = k_{+2}[ES] . \quad (2)$$

3. Константа диссоциации определяется соотношением

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

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

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

В то же время из уравнения (3) следует, что

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

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

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

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

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

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

Следовательно,

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

Выражение (7) есть не что иное, как уравнение Михаэлиса–Ментен для ферментативной кинетики, а величина  $K_m = K_s$  представляет собой *меру сродства фермента к субстрату*. Численно она равна такой концентрации субстрата, при которой начальная скорость ферментативной реакции составляет половину максимальной скорости. Уравнение (7) графически выражается гиперболой (рис. 2.3).

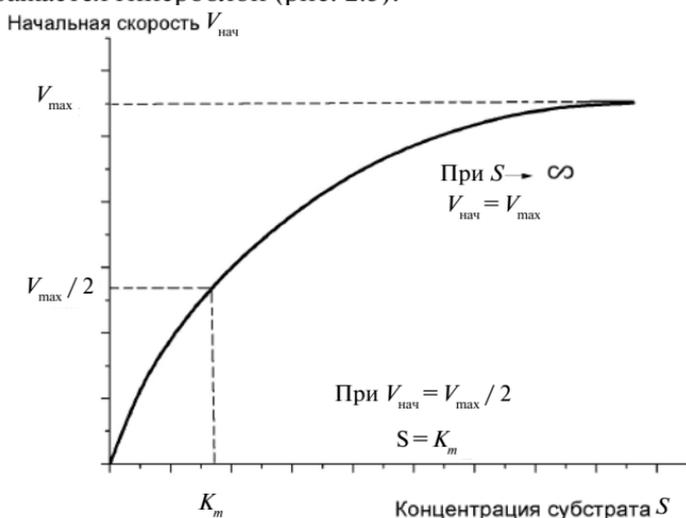


Рис. 2.3. График Михаэлиса–Ментен

Однако для практического определения кинетических параметров график гиперболы, которым изображается уравнение Михаэлиса–Ментен, неудобен, а кроме того требует использования концентраций субстрата, «насыщающих» фермент, что не всегда достижимо при ограниченной растворимости субстрата.

Поэтому обычно стремятся преобразовать уравнение Михаэлиса–Ментен в такую форму, чтобы графически оно изображалось прямой линией. Чаще всего для этого используют метод Лайнуивера–Берка, представляя уравнение Михаэлиса–Ментен в виде уравнения прямой линии ( $y = a + bx$ ):

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

Последнее выражение называют уравнением Лайнуивера–Берка, и для расчета кинетических параметров используют график, построенный в координатах:  $1/V$  и  $1/S$ . В результате получается прямая, отсекающая на оси ординат отрезок, равный  $1/V_{\max}$ , а на продолжении оси абсцисс – отрезок, равный  $-1/K_m$  (рис. 2.4).

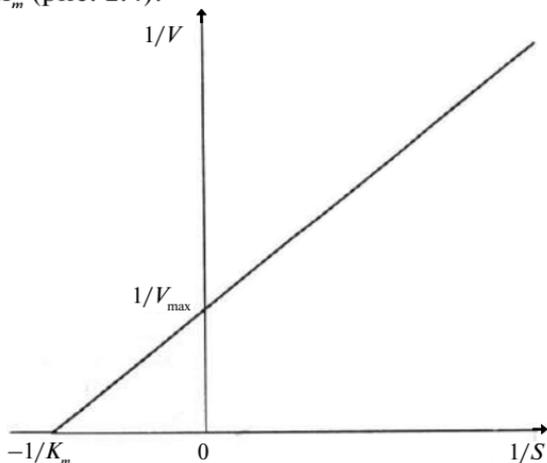


Рис. 2.4. График Лайнуивера–Берка

Следует отметить, что при использовании графика Лайнуивера–Берка точки в области высоких концентраций субстрата располагаются слишком густо, а положение прямой линии во многом зависит от точек в области низких концентраций субстрата, где определение скорости менее надежно. Кроме того, реальные экспериментальные данные не всегда адекватно аппроксимируются в виде прямой линии. Поэтому предложено еще несколько приемов для определения кинетических параметров.

Метод Эди–Хофсти также основан на преобразовании уравнения Михаэлиса–Ментен. Умножив обе части уравнения на  $V_{\max}$  и преобразовав его, получим:

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

График этого уравнения в координатах  $V$  и  $V/S$  представляет собой прямую линию, отсекающую на осях ординат и абсцисс отрезки, равные  $V_{\max}$  и  $V_{\max}/K_m$  соответственно (рис. 2.5).

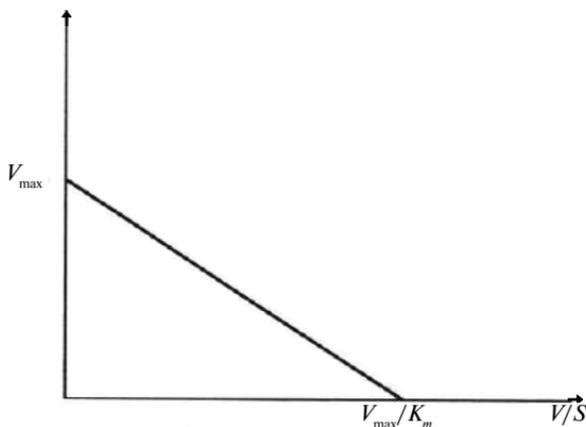


Рис.2.5. График Эдди-Хофсти

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

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

В данном случае для каждого значения  $V$  и  $S$  строится прямая в координатах  $V$  и  $S$ . Точка пересечения всех этих прямых имеет координаты:  $V_{\max}$  (ордината) и  $K_m$  (абсцисса) (рис. 2.6).

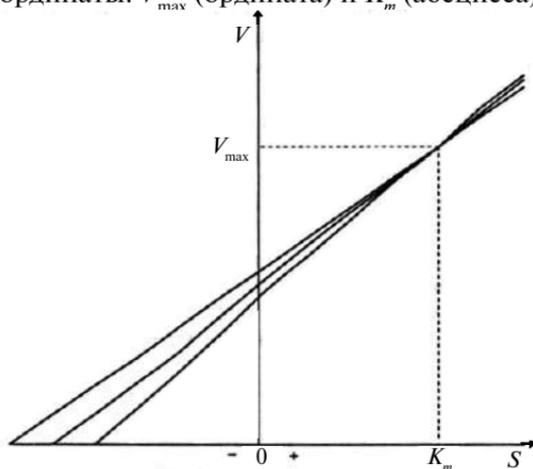


Рис.2.6. График Эйзенталя и Корниш-Боуден

## 2.3. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

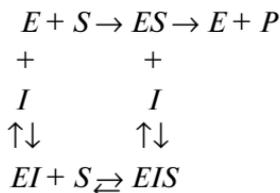
### 2.3.1. ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ

Изучение подавления активности ферментов служит одним из способов расшифровки механизма их действия. Подходом к решению последней задачи является изучение специфичности действия ферментов. В свою очередь это требует корректного измерения кинетических параметров в присутствии изучаемого аналога субстрата. В настоящей главе будут рассмотрены способы определения характера взаимоотношений субстратов, их аналогов и ингибиторов ферментативной активности с помощью вычисления ряда кинетических параметров. Более подробно механизмы регуляции ферментативной активности путем конкурентного или неконкурентного взаимодействия эффекторов с ферментами будут рассмотрены в разд 4.3.

### 2.3.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПА ИНГИБИРОВАНИЯ

*Ингибиторы* ферментов можно разделить на две основные группы: *обратимые* и *необратимые*. После удаления (например, диализом) ингибитора первого типа активность фермента восстанавливается; ингибитор второго типа удалить не удается или активность фермента не восстанавливается даже после удаления ингибитора (наступает денатурация ферментного белка).

Необратимое ингибирование достигает максимума, когда весь фермент связан с ингибитором. Обратимое ингибирование достигает состояния равновесия, положение которого определяется *константой ингибирования* ( $K_i$ ), характеризующей сродство фермента к ингибитору. Схема обратимого ингибирования имеет следующий вид:



Здесь  $I$  – ингибитор,  $EI$  – комплекс «фермент-ингибитор»,  $EIS$  – комплекс «фермент-ингибитор-субстрат». При этом если константа диссоциации комплекса

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

то константа ингибирования

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

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

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

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

Взаимоотношения между константами ферментативной кинетики при этих типах ингибирования приведены на рис. 2.7.

Для определения типа ингибирования обычно используют график *Лайнуивера–Берка*, полученный для данного субстрата без ингибитора и с ним.

При конкурентном ингибировании, если определена величина  $K_m$  в присутствии ингибитора (обозначим ее  $K_{m1}$ ), можно рассчитать константу ингибирования ( $K_i$ ) по следующей формуле:

$$K_i = \frac{K_m I}{K_{m1} - K_m}.$$

При неконкурентном ингибировании, определив измененную величину  $V_{\max}$  ( $V_{\max 1}$ ), можно рассчитать  $K_i$  по формуле:

$$K_i = \frac{V_{\max 1} I}{V_{\max} - V_{\max 1}}.$$

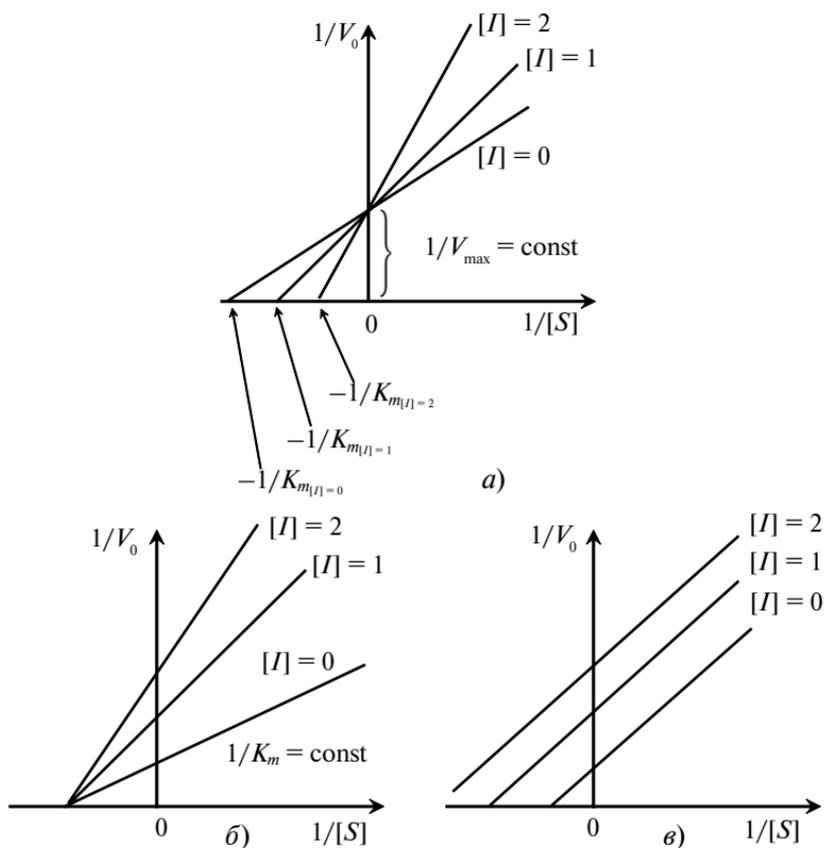


Рис. 2.7. Вид графика Лайнуивера–Берка при разных типах ингибирования:

*a* – конкурентное; *b* – неконкурентное; *v* – бесконкурентное

## Глава 3

# ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА

### 3.1. ПРИНЦИПЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ

#### 3.1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Живые системы характеризуются постоянным потоком энергии и строительных материалов, нарушающих их равновесие с окружающей средой, которое наступает только после смерти организма. Состояние так называемого устойчивого равновесия (steady-state) живого организма в действительности является динамическим состоянием, в результате чего жизнь противодействует повышению энтропии, сопровождающему процессы, происходящие в неживой природе, которые в конечном счете могли бы привести к «тепловой смерти» Вселенной.

Совокупность всех биохимических процессов в клетках, приводящих к образованию живого вещества из «питательных веществ» среды или внутриклеточных промежуточных продуктов, обеспечивающих поддержание активности живых клеток, называют *метаболизмом* (от греч. μεταβολη [metabole] – изменение, перемена, превращение). Эти процессы в клетке взаимосвязаны и взаимозависимы, тем не менее часть из них преимущественно выполняет функцию построения компонентов клетки, а часть – снабжения источниками энергии этих «строительных работ». Поэтому принято разделять биохимические процессы на два основных типа:

1) *ассимиляционный (конструктивный)*, называемый *анаболизмом*, включающий синтез низкомолекулярных предшественников и построения из них молекул биополимеров;

2) *диссимиляционный (энергетический)*, называемый *катаболизмом*, заключающийся в обеспечении источника энергии («энергетического привода»), приводящего в движение анаболизм.

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

### 3.1.2. Пути и механизмы преобразования энергии в живых системах

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

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

В клетках, как и в неживых системах, самопроизвольно протекают только те химические процессы, которые приводят к уменьшению свободной энергии системы, т. е. той доли общей энергии, которая может быть превращена в работу ( $\Delta G < 0$ ). Такие реакции называются *экзергоническими*. Напротив, если  $\Delta G > 0$ , то реакция не может протекать самопроизвольно, поскольку требуется приток энергии (*эндэргонические* реакции). Для количественного описания этих случаев кратко напомним основные закономерности химической термодинамики.

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

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

где  $\Delta H$  – изменение энтальпии;  $\Delta S$  – изменение энтропии;  $T$  – абсолютная температура, К.

При реакциях в растворах изменение свободной энергии определяется уравнением

$$\Delta G = \Delta G^0 + 2,303 RT \lg K_{\text{eq}},$$

где  $R$  – газовая постоянная ( $1,987 \text{ кал}\cdot\text{моль}^{-1} \text{ К}$ );  $K_{\text{eq}}$  – константа равновесия химической реакции;  $\Delta G^0$  – стандартное изменение свободной энергии.

При стандартных условиях (давление 1 атм, температура  $25^\circ \text{C}$  или  $298 \text{ К}$  и  $\text{pH} = 7,0$ ) каждая химическая реакция характеризуется свободной энергией, вычисляемой по формуле (в состоянии равновесия  $\Delta G = 0$ )

$$\Delta G^0 = -2,303 RT \lg K_{\text{eq}} \text{ или } \Delta G^0 = -1,363 \lg K_{\text{eq}} \text{ ккал}\cdot\text{моль}^{-1} \text{ при } 25^\circ \text{C}.$$

При окислительно-восстановительных реакциях изменение свободной энергии определяется уравнением

$$\Delta G^0 = \Delta G^0_{\text{ox}} - \Delta G^0_{\text{red}} = nF(E'_{0\text{ox}} - E'_{0\text{red}}),$$

где  $n$  – количество перенесенных электронов;  $F$  – число Фарадея: заряд 1 М электронов ( $23062 \text{ кал}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{В}^{-1}$ );  $E'_0$  – стандартный окислительно-восстановительный потенциал (при  $\text{pH} = 7,0$ ) для окислителя и восстановителя, В.

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

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

$$\text{для системы } \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} \quad E'_{0\text{ox}} = +0,815 \text{ В}; n = 2.$$

Таким образом,

$$\Delta G = 2 \cdot 23 \cdot 62 \text{ кал}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{В}^{-1} [0,815 - (-0,32)] \text{ В} = 52351 \text{ кал}\cdot\text{моль}^{-1}.$$

### 3.1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

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

*Аэробное дыхание* – энергетический процесс, при котором конечным акцептором электронов окисляемого субстрата, передающихся по электрон-транспортной цепи, является *молекулярный кислород* (см. разд. 3.2).

*Анаэробное дыхание* — процесс, в котором конечными акцепторами электронов являются другие окислители: сульфат-, нитрат- или нитрит- анионы, катионы металлов, органические вещества (см. разд. 3.2).

*Брожение* — энергетический процесс, при котором электроны передаются непосредственно от донора к акцептору без участия электрон-транспортной цепи: гликолиз и другие виды брожений (см. разд. 3.3).

Перечисленные процессы можно классифицировать на основе *механизма* образования АТФ, являющегося основным макроэргическим соединением в клетке, запаасающим энергию в химических связях своей молекулы. Различают образование АТФ в результате переноса электронов по дыхательной цепи — *окислительное фосфорилирование*, а также образование АТФ в процессах, не связанных с переносом электронов по цепи (брожение), — *субстратное фосфорилирование*. В настоящее время первый тип процессов (т. е. окислительное фосфорилирование) правильнее называть *образованием АТФ за счет трансформации энергии трансмембранного электрохимического градиента (ТЭГ) ионов*, или сокращенно — *мембранным фосфорилированием*.

У *фототрофных* организмов (растений, фотосинтезирующих бактерий) основным способом запасания энергии является *фотофосфорилирование*, т.е. образование АТФ путем трансформации энергии ТЭГ протонов, формируемого за счет утилизации световой энергии.

#### 3.1.4. Роль АТФ и ТЭГ в запасании энергии

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

Почему в процессе эволюции именно АТФ выпала такая роль? Для этого есть несколько причин, обусловленных химическими и физико-химическими свойствами данного соединения.

На рис. 3.1 представлено строение молекулы АТФ.

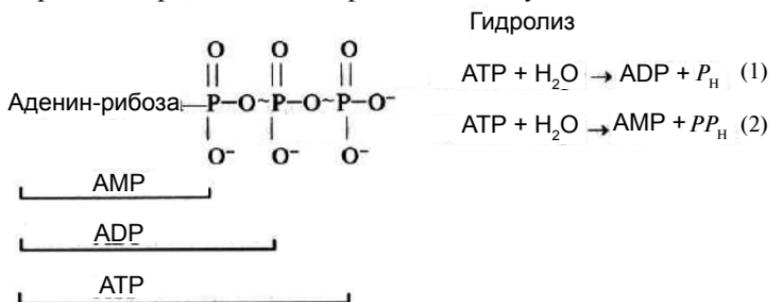


Рис. 3.1. Схема строения АТФ

В ней содержится нуклеозид аденозин, в котором остатки пуринового основания аденина и сахара рибозы связаны N(9)-С(1)-гликозидной связью. В свою очередь 5-ОН-группа аденозина связана с цепочкой из трех фосфорильных групп простой фосфоэфирной связью. Три фосфорильные группы соединены между собой лабильными фосфоангидридными связями.

1. Изменение свободной энергии при гидролизе фосфоангидридных связей довольно велико — около 10 ккал·моль<sup>-1</sup>. Если необходима энергия, меньшая или равная 10 ккал·моль<sup>-1</sup>, гидролиз идет по реакции (1) (рис 3.1). Если необходима энергия ненамного большая, чем 10 ккал·моль<sup>-1</sup>, — по реакции (2). При необходимости значительно большего количества энергии используется несколько молекул АТФ в одном процессе. Дополнительная энергия может также выделяться при *сорбции* АТФ на ферменте, как упомянуто выше.

Скорость неферментативного гидролиза АТФ мала, т.е. молекула химически стабильна, и запасенная в ней энергия не рассеивается в виде тепла при спонтанном гидролизе. Однако замена фосфора на мышьяк резко повышает лабильность. Этим обстоятельством объясняется ингибиторное действие арсената ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) на энергетический метаболизм: конкурируя с ортофосфатом, он включается вместо него в АТФ, а образовавшееся соединение подвергается спонтанному гидролизу.

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

3. Выбор АТФ как нуклеотида был вызван, по-видимому, необходимостью взаимодействия с белками, взаимодействие которых с моно- и полинуклеотидами лежит в основе жизнедеятельности клетки (например, в процессах синтеза биополимеров).

4. Выбор в качестве пуриновой части молекулы аденозина, вероятно, обусловлен его промежуточными *электронодонорными* и *электроноакцепторными* свойствами, что обеспечивает взаимодействие АТФ с широким кругом партнеров. Кроме того, среди азотистых оснований аденин наиболее устойчив к действию ультрафиолета, что могло иметь важное значение на ранних этапах формирования живых систем.

Для объяснения механизма образования АТФ путем мембранного фосфорилирования П. Митчеллом в 1961 г. предложена *хемиосмотическая теория сопряжения окисления и фосфорилирования*. В настоящее время она общепризнанна, а ее автор награжден Нобелевской премией.

Согласно этой теории в «сопрягающих» мембранах (цитоплазматическая мембрана у прокариот, мембрана митохондрий или хлоропластов у эукариот) локализовано несколько типов систем («насосов», pumps), способных к транслокации (трансмембранному переносу) ионов. В случае протонов это *электрон-транспортная (дыхательная) цепь* и *H<sup>+</sup>-АТФазы (АТФ-синтаза)*, координированная работа которых приводит к формированию *трансмембранной разности электрохимического градиента (ТЭГ) протонов* («протон-движущей силы», proton motive force, pmf,  $\Delta p$ ). Энергия, получаемая при переносе электронов по дыхательной цепи, аккумулируется в виде свободной энергии ТЭГ протонов, который формируется за счет переноса протонов из цитоплазмы на наружную сторону мембраны. Синтез АТФ осуществляется АТФ-синтазой при обратном переносе протонов в цитоплазму с использованием свободной энергии ТЭГ протонов.

Таким образом, *первичной формой запасаения энергии* в процессе дыхания является ТЭГ протонов (рис 3.2).

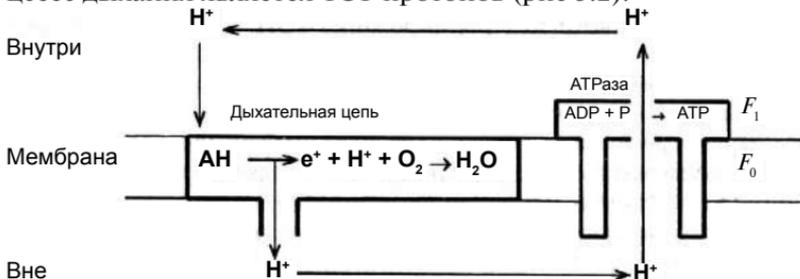


Рис. 3.2. Схема циркуляции протонов

В процессе дыхания протоны окисляемого субстрата выбрасываются из мембраны с помощью протонных насосов дыхательной цепи во внешнюю среду (или периплазму в случае прокариот и в межмембранное пространство митохондрий в случае эукариот. Поскольку мембрана практически непроницаема для протонов, их возврат в клетку возможен только через канал АТпазы (и другие транспортные каналы), при этом АТпаза трансформирует энергию ТЭП в АТФ (или энергия ТЭП непосредственно используется для обеспечения других эндэргонических процессов: транспорта, движения и т.д., см. рис. 3.3).

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

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

Здесь  $2,3 RT/F = Z = 59 \text{ мВ}$  при  $25^\circ\text{C}$ ;  $\Delta p$  – протон-движущая сила;  $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{вых}} - \text{pH}_{\text{вх}} < 0$ , где  $\text{pH}_{\text{вых}} - \text{pH}_{\text{вх}}$  снаружи цитоплазматической мембраны,  $\text{pH}_{\text{вх}} - \text{pH}$  внутри клетки.

Для образования АТФ необходимы  $\Delta G \approx 250 \text{ мВ}$  и перенос двух протонов. Примерно такая величина ТЭГ протонов и создается на мембранах митохондрий и прокариотических клеток, хотя вклад каждой из составляющих различен. Например, у ацидофильных бактерий ТЭГ практически полностью состоит из  $\Delta\text{pH}$ , а у алкалофилов – из  $\Delta\phi$  (из-за того, что внутриклеточный рН поддерживается довольно постоянным (около 7 – 8) и при варьировании внешнего рН изменяется незначительно.

Важно отметить, что АТРазный комплекс может не только *утилизировать* ТЭГ с образованием АТР, но и *формировать* его за счет гидролиза АТР (образованного, например, путем субстратного фосфорилирования), осуществляя таким образом взаимное превращение этих двух форм аккумулированной энергии.

Более поздним дополнением к теории хемиосмотического сопряжения П. Митчелла является концепция так называемой *натриевой биоэнергетики*, т. е. возможности существования  $\text{Na}^+$ -зависимых АТРаз, использующих для запасания энергии в форме АТР трансмембранный электрохимический градиент ионов  $\text{Na}^+$  вместо градиента протонов. Условия, способствующие формированию и функционированию систем натриевой биоэнергетики, создаются при щелочной реакции среды, когда внешняя концентрация протонов очень невелика и создать ТЭГ протонов для синтеза АТР практически невозможно. В таких условиях существуют, например, микроорганизмы-алкалофилы, оптимум рН для роста которых лежит в области 9 – 10.

Однако градиент ионов  $\text{Na}^+$  может формироваться и при более низких рН за счет функционирования других (не дыхательных) механизмов. Так, например, у гомоацетогенных бактерий *Acetobacterium woodii* ТЭГ катионов  $\text{Na}^+$  формируется в результате функционирования электрогенного «насоса», сопряженного с циклом Вуда-Люндала (см. разд. 3.3), выбрасывающего в окружающую среду катионы  $\text{Na}^+$ . Этот градиент может непосредственно использоваться для энергетического обеспечения вращения жгутиков или превращаться в АТР с помощью  $\text{Na}^+$ -АТРазы.

Еще один механизм формирования ТЭГ катионов  $\text{Na}^+$  обнаружен у некоторых анаэробных бактерий, обладающих декарбоксилазами, действующими как первичные  $\text{Na}^+$ -насосы. Например, у *Klebsiella pneumoniae* ТЭГ катионов  $\text{Na}^+$  создается в процессе функционирования оксалоацетат-декарбоксилазы. Сходные механизмы функционируют у *Propionigenium modestum*, формирующего ТЭГ катионов  $\text{Na}^+$  с помощью метилмалонил-КоА-декарбоксилазы. Далее посредством  $\text{Na}^+$ -АТРазы энергия ТЭГ катионов  $\text{Na}^+$  преобразуется в АТР.

### 3.1.5. ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ГЕНЕРАТОРЫ ТЭГ

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

- дыхательная цепь, содержащая от одного до трех протонных насосов;
- фотосинтетическая цепь, содержащая один или два протонных насоса;
- бактериородопсин галобактерий (архей);
- системы экскреции кислых продуктов брожения (например, лактата) или ионов натрия.

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

Таким образом, основные пути трансформации энергии в клетке можно суммировать в виде схемы, приведенной на рис. 3.3.

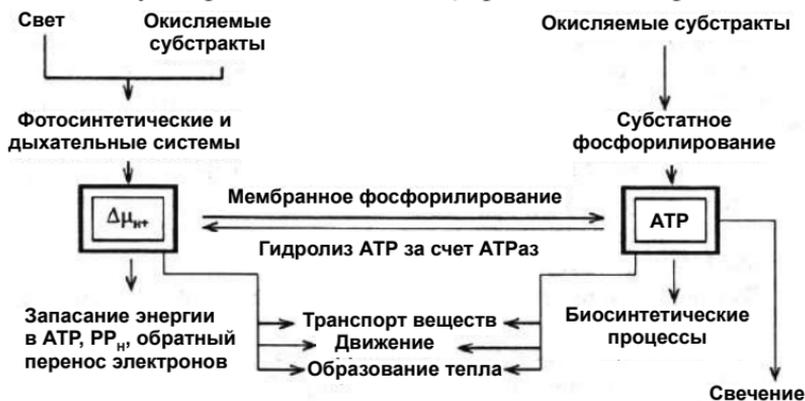


Рис. 3.3. Схема трансформации энергии в живой клетке

Аналогичную АТРазам роль вторичного генератора ТЭГ играют пирогосфатазы, преобразующие энергию пирогосфатной связи в ТЭГ протонов или (как установлено в последнее время для ряда бактерий и архей, а именно: *Methanosarcina mazei* thermophile, *Moorella thermoacetica* и гипертермофильной бактерии *Thermotoga maritima*) в ТЭГ катионов  $Na^+$ .

**Энергетический заряд и энергетическая эффективность роста.** Количество АТР, образующегося в разных метаболических путях, различается во много раз. Так, при *катаболизме глюкозы* по гликолитическому пути с последующим включением цикла трикарбоновых кислот и дыхания (с тремя пунктами сопряжения окисления и фосфорилирования) образуется 38 молей АТР на 1 моль использованной глюкозы.

У некоторых бактерий (типа *Escherichia coli*) в дыхательной цепи существуют лишь два пункта сопряжения, и количество образованного АТР составляет 26 молей на моль глюкозы. Сам по себе гликолиз в анаэробных условиях приводит к образованию лишь 2 молей АТР на 1 моль глюкозы (например, у молочнокислых бактерий).

Не только общее количество синтезированного АТР, но и затраты АТР на образование единицы биомассы сильно зависят от типа метаболизма. Так, например, при выращивании бактерий на среде с глюкозой 1 моль АТР обеспечивает образование 27 г биомассы, тогда как на среде с  $\text{CO}_2$  (в качестве единственного источника углерода) 1 моль АТР дает только 5 г биомассы. При различных типах анаэробных брожений выход биомассы (в граммах) в расчете на моль синтезированного АТР все же достаточно постоянен и составляет около 10. Этот показатель получил обозначение  $Y_{\text{АТР}}$  и используется для характеристики роста наряду с экономическим коэффициентом (равным отношению массы образовавшихся клеток к массе использованного субстрата).

Определенная часть энергии в клетке затрачивается на процессы, не связанные непосредственно с ростом. Их называют *процессами поддержания жизнедеятельности* (осмотическая работа, подвижность, обновление клеточного материала и т.д.). Затраты на поддержание жизнедеятельности составляют 10–20% всех энергетических расходов, но могут существенно возрастать в условиях стресса.

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

$$\text{ЭЗ} = 1/2 \frac{2\text{ATP} + \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}} = \frac{\text{ATP} + 0,5\text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

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

### 3.1.6. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ СОПРЯЖЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ И КОНСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Первоначально биологи подразделяли все живые организмы по типу питания на две группы: *автотрофов*, организмов, строящих вещества своих клеток из углекислоты (типичный пример – растения, которые обходятся без органической пищи), и *гетеротрофов*, требующих органических веществ для своей жизни (животные, грибы и большинство бактерий).

В настоящее время применяется более детальная классификация, основанная на указании природы источников энергии и углерода. Соответственно, в названии типа питания организма используются следующие обозначения, приведенные в табл. 3.1.

Таблица 3.1

#### Зависимость типа питания от вида аккумулируемой энергии, природы донора электронов и источника углерода

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

Таким образом, согласно этой классификации растения следует отнести к *фото-лито-автотрофам*, а животных – к *хемо-органогетеротрофам*.

Всего же при сочетании этих характеристик возможны восемь основных типов соотношений между энергетическими и конструктивными процессами (табл. 3.2).

Таблица 3.2

## Основные типы питания

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Тип питания	Организмы-представители
Химические реакции	Неорганические вещества	CO <sub>2</sub>	Хемолитоавтотрофия	Прокариоты (водородные, нитрифицирующие и др. бактерии)
		Органические вещества	Хемолитогетеротрофия	Прокариоты (водородные, метановые и др. бактерии)
	Органические вещества	CO <sub>2</sub>	Хеморганолитотрофия	Прокариоты (метилотрофы, окисляющие формилат)
		Органические вещества	Хеморганолитогетеротрофия	Животные и многие прокариоты
Свет	Неорганические вещества	CO <sub>2</sub>	Фотолитоавтотрофия	Растения, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии
		Органические вещества	Фотолитогетеротрофия	Прокариоты (некоторые цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)
	Органические вещества	CO <sub>2</sub>	Фотоорганолитотрофия	Прокариоты (некоторые пурпурные бактерии)
		Органические вещества	Фотоорганолитогетеротрофия	Прокариоты (галобактерии, цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии)

Некоторые организмы способны осуществлять только один из перечисленных типов метаболизма (например, растения, грибы и животные), тогда как другие могут переключаться с одного типа питания на другой (бактерии). Последние организмы называют *факультативными* (например, некоторые цианобактерии способны существовать как фотолитоавтотрофно, так и хеморганолитогетеротрофно). Возможно также существование *миксотрофного* типа питания, когда одновременно используются два вида энергетических процессов или два вида источников питания (например, сульфид и органические доноры электронов в качестве окисляемых субстратов, а также углекислота и органические вещества в качестве источников углерода).

### 3.1.7. ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА КОНЕЧНОГО АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ В ПРОЦЕССЕ ДЫХАНИЯ

В природных экотопах для микроорганизма обычно доступен ряд конечных акцепторов электронов. Поскольку экономически выгодно синтезировать ограниченный набор переносчиков электронов, формирующих дыхательную цепь, возникает необходимость выбора конечного акцептора из присутствующих в окружающей среде. Естественное предпочтение отдается акцепторам, присутствующим в больших количествах и имеющим наиболее высокий окислительно-восстановительный потенциал, что обеспечивает наибольший выход энергии. Именно поэтому факультативные анаэробы при прочих равных условиях предпочитают молекулярный кислород. При дефиците кислорода эти микроорганизмы начинают использовать в качестве конечных акцепторов электронов нитрат, трехвалентное железо, фумарат, триметиламин-N-оксид или диметилсульфоксид. Акцепторы с менее положительным окислительно-восстановительным потенциалом (сульфат и двуокись углерода) используются обычно только теми анаэробами, которые неспособны использовать кислород.

Следует, однако, учитывать, что способность использовать те или иные акцепторы электронов зависит не только от термодинамических соображений, но также от особенностей эволюции микроорганизма в специфических экологических условиях. Например, представители рода *Wolinella* предпочитают использовать в качестве конечного акцептора электронов элементную серу, а не нитрат, хотя последний имеет значительно более высокий окислительно-восстановительный потенциал.

## 3.2. АЭРОБНЫЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

### 3.2.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

По отношению к молекулярному кислороду организмы подразделяются на *аэробов*, для которых кислород необходим, и *анаэробов*, для которых кислород токсичен.

В свою очередь аэробы и анаэробы подразделяются на *облигатные* (обязательные) и *факультативные* (необязательные) (рис.3.4).

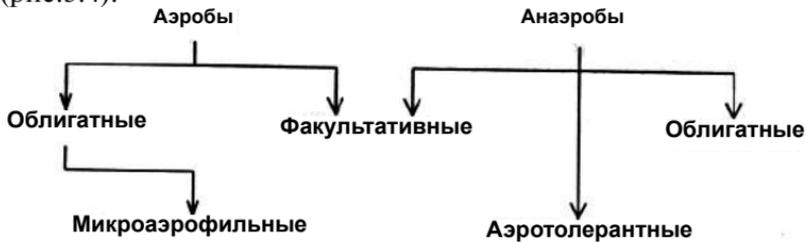


Рис. 3.4. Классификация микроорганизмов по степени аэробности и анаэробности

Некоторые облигатные аэробы могут существовать при содержании кислорода, равном его содержанию в атмосфере (21%) или даже превышающем эту величину (до 50%), но встречаются и такие, которые не переносят уровень кислорода, превышающий несколько процентов (*микроаэрофилы*). В то же время некоторые анаэробы, хотя и не используют кислород, но переносят его довольно высокие концентрации в окружающей среде (*аэротолеранты*). Ряд микроорганизмов может резко менять чувствительность к кислороду в зависимости от типа питания, например водородные бактерии при выращивании в гетеротрофных условиях аэротолерантны, а в автотрофных – микроаэрофильны. Более подробно регуляторная роль кислорода рассмотрена в разд. 5.2.

### 3.2.2. АЭРОБНОЕ ДЫХАНИЕ. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

При аэробном дыхании в качестве конечного акцептора электронов используется молекулярный кислород. Аэробное дыхание характерно для большинства животных и растений и широко распространено в мире прокариот. На первом его этапе субстраты подвергаются *дегидрированию* с участием специфических ферментов – *дегидрогеназ*. Образующиеся в результате дегидрирования восстановленные NAD или FAD (FMN), соответственно  $\text{NADH}$ ,  $\text{FAD}_{\text{восст}}$  ( $\text{FMN}_{\text{восст}}$ ), вступают в дыхательную цепь (рис. 3.5).

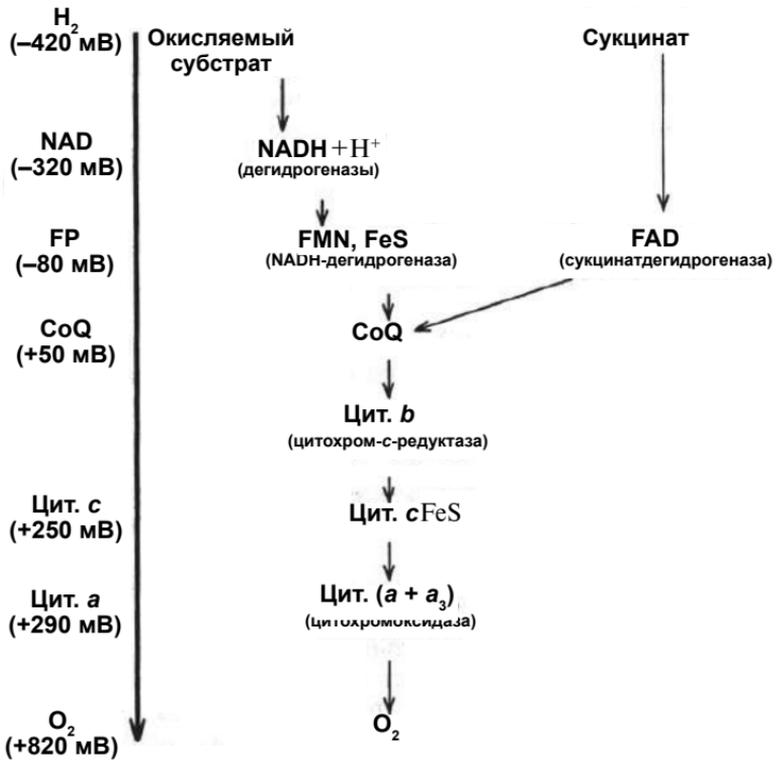


Рис. 3.5. Упрощенная схема дыхательной цепи, характерная для митохондрий и некоторых бактерий. В такой цепи протонными «насосами», создающими ТЭП, являются NAD- и сукцинатдегидрогеназы, цитохром-с-редуктаза и цитохромоксидаза NAD – никотинамид-адениндинуклеотид; FP – флавопротеины, содержащие FMN (флавиномононуклеотид) или FAD (флаavin-адениндинуклеотид) и FeS (железо-серные центры); CoQ – кофермент Q (убихинон); Цит. b, c, a – соответствующие цитохромы

Основной субстрат дыхания – *восстановленный NAD* – образуется в результате катаболизма сахаров, органических кислот, аминокислот и других субстратов в метаболических путях, которые прямо не зависят от присутствия кислорода и могут функционировать в анаэробных условиях. К ним относятся *гликолиз* и другие пути метаболизма сахаров, *цикл трикарбоновых кислот*, *системы окисления жирных кислот* и др. Полученный в результате дегидрирования субстратов NADH частично используется

в конструктивных процессах (в том числе после передачи протонов на NADP путем *трансгидрогеназной реакции*), а в основном окисляется через дыхательную цепь.

Природу компонентов дыхательной цепи и порядок их расположения определяли физико-химическими и биохимическими методами, среди которых важное место занимают *дифференциальная спектрофотометрия* и *ингибиторный анализ*. Их сочетание позволяет определить, какие именно компоненты участвуют в окислении данного субстрата и какова последовательность их расположения в дыхательной цепи. Окончательное доказательство можно получить путем реконструкции конкретного участка дыхательной цепи в искусственных или природных мембранах с применением изолированных компонентов.

В качестве классических *специфических ингибиторов дыхательной цепи* используют следующие вещества:

- ингибиторы *NADH*-дегидрогеназы: барбитураты (например, амитал — 5-этил-5-изоамилбарбитурат натрия, обычная концентрация  $10^{-3}$  М); *ротенон* (инсектицид, получаемый из растительного сырья,  $10^{-6}$  М);
- ингибитор цитохром-с-редуктазы: антимицин А ( $10^{-6}$  —  $10^{-7}$  М);
- ингибиторы цитохромоксидазы: KCN ( $10^{-3}$  М);  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-3}$  М); CO (50% в газовой фазе).

При превышении указанных концентраций возможны побочные эффекты из-за ограниченной специфичности действия данных ингибиторов. Кроме того, некоторые из этих ингибиторов (например, антимицин А) могут лишь в незначительной степени проникать через клеточные оболочки определенных организмов (например, грамотрицательных бактерий), поэтому практически не влияют на их дыхание. Наконец, существуют альтернативные цитохромоксидазы, не подавляемые цианидом и другими классическими ингибиторами (так называемое *цианидрезистентное дыхание*).

Кроме того, существует особый класс ингибиторов — *разобщителей окислительного фосфорилирования*, которые подавляют формирования ТЭГ протонов, не влияя существенно на восстановление кислорода. Классическим примером такого разобщителя является 2,4-динитрофенол ( $10^{-3}$  М). Более эффективным разобщителем является, например, карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон ( $10^{-6}$  М), а также анти-

биотик моненсин ( $10^{-6}$  М), который «разряжает» ТЭГ как протонов, так и катионов натрия.

Следует учитывать, что в отличие от митохондрий, состав дыхательной цепи у прокариот может зависеть не только от вида микроорганизма, но и от типа его питания, а также от содержания кислорода в газовой фазе. Пример – дыхательная цепь *Escherichia coli* (рис. 3.6).

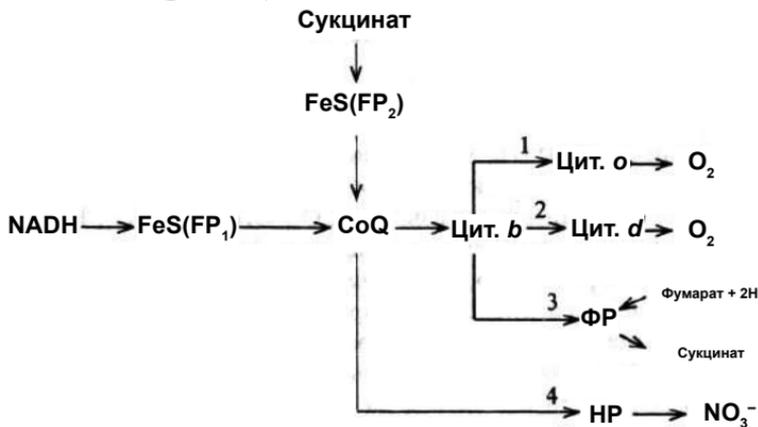


Рис. 3.6. Схема дыхательной цепи *Escherichia coli*.  
(обозначения, как на рис. 3.5)

Путь 1 реализуется в аэробных условиях. Путь 2 существует в микроаэробных условиях (при низком содержании кислорода). Пути 3 и 4 функционируют в анаэробных условиях с использованием в качестве конечных акцепторов электронов (и протонов) фумарата (ФР – фумарат-редуктаза) или нитрата (НР – нитратредуктаза)

**Обратный перенос электронов** в дыхательной цепи используется для образования восстановленных NAD в тех случаях, когда окисляемый субстрат (например, тиосульфат или  $\text{Fe}^{2+}$ ) имеет более высокий равновесный окислительно-восстановительный потенциал, чем система  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

Примером могут служить представители родов *Thiobacillus* (рис. 3.7, а) и *Nitrobacter* (рис. 3.7, б).

Последний микроорганизм способен расти хемолитоавтотрофно и использовать электроны нитрита для восстановления NAD(P), необходимого для фиксации  $\text{CO}_2$  и последующих биосинтетических процессов. Эта реакция сильно эндэргоническая, поскольку окислительно-восстановительный по-

тенциал донора (нитрита) превышает на 0,74 В окислительно-восстановительный потенциал акцептора NAD(P). Необходимую энергию поставляет ТЭГ протонов с участием компонентов дыхательной цепи. Таким образом, ТЭГ протонов, генерируемый за счет аэробного дыхания с нитритом, обеспечивает как синтез АТФ, так и восстановление NAD(P). Оба процесса подавляются разобщителями окислительного фосфорилирования.

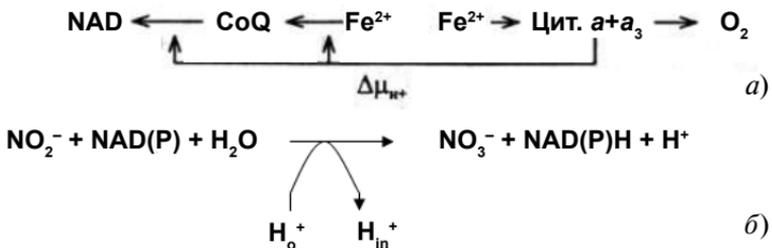


Рис. 3.7. Схемы обратного переноса электронов:

а – в дыхательной цепи *Thiobacillus ferrooxidans* (с упрощениями);

б – в дыхательной цепи *Nitrobacter sp.*

Принципиально сходный механизм обратного переноса электронов существует у *Thiobacillus ferrooxidans*, использующей катионы  $\text{Fe}^{2+}$  в качестве донора электронов для аэробного дыхания. Поскольку при функционировании обратного переноса электронов в дыхательной цепи остается только один пункт, где синтезируется АТФ, для удовлетворения своих энергетических потребностей клетки должны функционировать с повышенной скоростью. Поэтому скорость дыхания этого микроорганизма в пересчете на 1 мг белка в 7 раз выше, чем у митохондрий.

### 3.2.3. ЭВОЛЮЦИЯ АЭРОБНЫХ КАТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Системы аэробного дыхания современных организмов являются продуктом длительной эволюции жизни от анаэробных к аэробным условиям. Принято считать, что первичная атмосфера Земли носила восстановительный характер и практически не содержала кислорода. В нее в основном входили такие

газы, как  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$  и некоторые другие – в меньших количествах. Поэтому первые живые организмы, скорее всего, были анаэробами.

Основная масса кислорода образовалась, по-видимому, в результате жизнедеятельности фотосинтезирующих организмов (цианобактерий и, значительно позднее, растений). Ископаемые остатки свидетельствуют, что жизнь на Земле существует около 3,8 млрд лет (на основании измерения соотношения изотопов углерода  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), тогда как первые микроаэробные микроорганизмы могли появиться на Земле около 2 млрд лет назад (при концентрации кислорода 0,2%). Основная же масса аэробных прокариот возникла позже, когда концентрация кислорода в атмосфере достигла 2% (около 400 млн лет тому назад). Предполагаемая эволюция от анаэробности к аэробности выглядит так:

Анаэробы → Фототрофы → Аэротолеранты → Аэробы → Аэробы  
(факультативные) (облигатные)

Эта схема соответствует представлениям о последовательности эволюционных событий, полученных на основании сходства генов изучаемых организмов 16S рРНК (рис. 3.8).

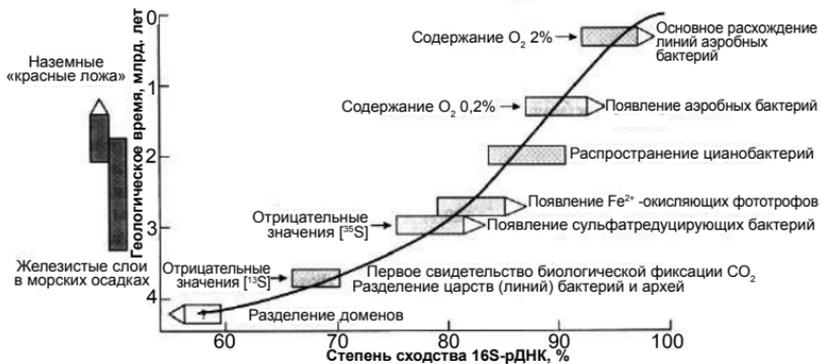
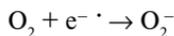


Рис. 3.8. Последовательность появления основных физиологических групп бактерий в процессе эволюции [8]

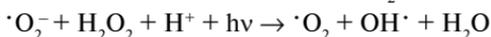
На начальных этапах эволюции организмы вынуждены были защищаться от окислительного действия кислорода и, вероятно, не обладали способностью запасать энергию, выделяющуюся при окислении субстратов с участием кислорода. Защита могла осуществляться двумя основными путями: пас-

сивным, т.е. переходом в экологические ниши, где кислород отсутствует, и активным — детоксикацией кислорода. Системы детоксикации сохранились и у современных организмов.

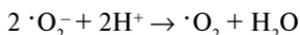
Одним из самых токсичных продуктов восстановления кислорода является *супероксидный анион-радикал*, образующийся при одноэлектронной реакции:



Такие анион-радикалы могут возникать в результате многих метаболических реакций: при взаимодействии с кислородом компонентов дыхательной и фотосинтетической цепей (восстановленных флавинов, хинонов, тиолов, железосерных белков и др.), а также абиогенно в результате фото- и электрохимических процессов в водной среде. Время жизни супероксидных анионов относительно велико, они могут проникать в клетки и превращаться в другие токсичные продукты: *гидроксильные радикалы* ( $\text{OH}^\cdot$ ) и *синглетный кислород* ( $^1\text{O}_2$ ):

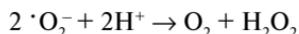


Радикал  $\text{OH}^\cdot$  образуется также при радиационном разложении воды и является самым сильным из всех известных окислителей. Относительно синглетного кислорода нужно отметить, что в норме электронные оболочки атома кислорода находятся в стабильном (триплетном) состоянии, однако при возбуждении (например, при поглощении кванта света) атом кислорода может переходить в синглетное состояние с повышенной реакционной способностью, которое возникает и при дисмутации супероксидного аниона:



Таким образом, клетке и в современных условиях необходимы защитные механизмы для детоксикации как супероксид-аниона, так и других активных форм кислорода (АФК).

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



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

Только после выработки систем защиты эволюция могла пойти в направлении создания систем, которые позволяют утилизировать энергию, получаемую при окислении субстратов с участием кислорода. Результатом такой эволюции и являются современные системы аэробного дыхания.

### 3.3. АНАЭРОБНЫЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

#### 3.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Одним из наиболее распространенных способов получения энергии в анаэробных условиях являются различные виды брожений. В случае животных и растительных клеток это *гликолиз*, у прокариот типы брожений значительно разнообразнее.

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

#### 3.3.2. АНАЭРОБНОЕ ДЫХАНИЕ

Механизм этого процесса сходен с аэробным дыханием, поскольку в нем, как правило, используется цепь переноса электронов, а энергия первично запасается в виде ТЭГ катионов (протонов или ионов натрия). Однако конечным акцептором электронов служит не кислород, а другие неорганические или

органические вещества. В зависимости от природы конечного акцептора различают сульфатное, нитратное, карбонатное, фумаратное и другие типы дыхания.

**Сульфатное дыхание.** Наряду с энергетическим процессом сульфатного дыхания существует *ассимиляционная сульфат-редукция*, обеспечивающая включение серы в органические вещества клетки. В этом процессе кроме сульфата могут участвовать сульфит и тиосульфат, которые используются бактериями и растениями в качестве источников серы. На первом этапе эти вещества транспортируются в клетку специфичной транспортной системой, как правило, общей для всех трех субстратов. Такая система у *E. coli* включает *периплазматический связывающий белок* (см. разд. 3.7.) и энергизуется гидролизом АТФ ( $1\text{ATP}/\text{SO}_4^{2-}$ ), однако эта затрата энергии не представляется расточительной, поскольку в органическом веществе клетки содержится не более 1% (по весу) восстановленной серы.

Ассимиляционное восстановление сульфата проходит несколько этапов. Первой стадией является *активация сульфата*, так как прямое восстановление сульфата до сульфита энергетически невыгодно (для  $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$   $E'_0 = -516$  мВ):



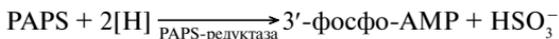
Данная реакция эндэргоническая, и движущей силой для нее является гидролиз пирогосфата (в случае *E. coli* показано также участие GTP):



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



Образовавшийся далее 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (PAPS) восстанавливается до сульфита с образованием 3'-фосфоаденозин-5'-фосфата:



Эта реакция протекает в два этапа с промежуточным образованием тиосульфатного эфира с белком-акцептором, например тиоредоксином (по схеме: акцептор-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Восстановление этого соединения приводит к освобождению сульфита и образованию дисульфидной формы акцептора. Сульфит восста-

навливается далее до сульфида с участием сульфитредуктазы, после чего сульфид связывается с О-ацетилсеринном, образуя цистеин. Такой путь восстановления сульфата присущ широкому кругу микроорганизмов, однако некоторые бактерии, по-видимому, восстанавливают не PAPS, а APS, подобно тому, как это происходит при *диссимиляционной сульфатредукции* (см. далее). Тиосульфат включается в ассимиляционный путь за счет образования S-сульфонатного производного О-ацетилсерина, которое затем восстанавливается в цистеин.

Все ферменты, катализирующие реакции ассимиляционной сульфатредукции, являются «растворимыми» (не связанными с мембранами), и их образование репрессируется цистеином. Избыток цистеина способен также подавлять активность фермента серинтрансацилазы, обеспечивающего образование О-ацетилсерина.

Способность к диссимиляционной сульфатредукции, или сульфатному дыханию, обнаружена у четырех неродственных групп микроорганизмов. Первая, наиболее многочисленная группа, относящаяся к  $\delta$ -подклассу протеобактерий, представлена несколькими родами с общей приставкой *Desulfo-*, а именно: *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfonemia*. Сюда же входят представители  $\epsilon$ -подкласса протеобактерий — *Desulfurella* и *Sulfurospirillum*. Вторая группа включает представителей грамположительных бактерий рода *Desulfotomaculum* (родственного клостридиям), в третью группу входят грамотрицательные представители рода *Thermodesulfobacterium* и, наконец, четвертую группу составляют археи рода *Archaeoglobus*.

Первым этапом метаболизма сульфата является его транспорт в клетку, поскольку все необходимые ферменты локализованы в цитоплазме. В случае пресноводных бактерий (например, некоторых представителей родов *Desulfovibrio* и *Desulfobulbus*) сульфат транспортируется в симпорте с протонами. У умеренно галофильных представителей (например, у представителей рода *Desulfococcus*) в процессе симпорта используются ионы  $\text{Na}^+$ . При очень низких (микромольных) концентрациях сульфата в среде изменяется стехиометрия транспорта: транспорт одного сульфат-аниона осуществляется в симпорте с тремя катионами ( $\text{H}^+$  или  $\text{Na}^+$ ), что позволяет

концентрировать сульфат в клетке в  $10^3$ – $10^4$  раз по сравнению с окружающей средой. Это облегчает последующее его восстановление.

На данном этапе восстановления, так же как и при ассимиляционной сульфатредукции, происходит активирование сульфата путем образования APS. Далее APS восстанавливается до сульфита с помощью APS-редуктаз, которые у всех изученных организмов представляют собой флавопротеины, содержащие железосерные центры.

Предполагается существование двух механизмов дальнейшего восстановления сульфита. В соответствии с одним из них сульфит восстанавливается в одну стадию путем присоединения шести электронов и без образования промежуточных продуктов. По второму механизму происходит поэтапное восстановление сульфита с промежуточным образованием тритионата и тиосульфата. Эти механизмы представлены на рис.3.9.

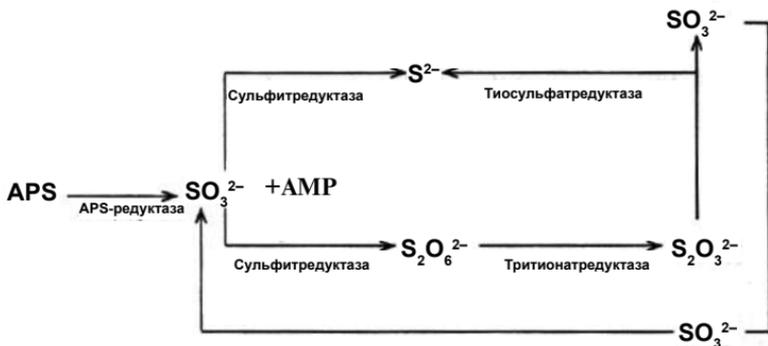


Рис. 3.9. Пути диссимиляционной сульфатредукции

Обнаружены четыре типа сульфитредуктаз, отличающихся по спектральным свойствам: десульфовиридин (зеленого цвета), десульфоруберин (красного цвета), десульфофусцидин (коричневого цвета), а также P-582 (аналог цитохрома P). Все они содержат сирогем (железотетрагидропорфирин типа изобактериохлорина, производное уропорфирина) и железосерные центры.

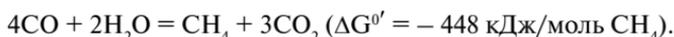
Способы запасания энергии сульфатредуцирующими бактериями до конца не установлены. Предполагается, что в связи с широкой встречаемостью у них компонентов стандартной (митохондриальной) дыхательной цепи — менахинонов и цитохромов — восстановление сульфита сопряжено с синтезом АТФ посредством трансформации ТЭГ протонов с участием  $\text{F}_1\text{F}_0$ -АТФсинтазы.

**Карбонатное дыхание.** Этот тип дыхания обнаружен у двух групп прокариот: *метаногенов* (встречающихся только среди архей) и *ацетогенов*. В настоящее время метаногенные археи подразделяют на три порядка, включающие шесть семейств, в которых описано 19 родов и более 50 видов.

Реакции образования метана можно подразделить на три группы. Во-первых, восстановление  $C_1$ -соединений молекулярным водородом или спиртами, содержащими 2 и более углеродных атомов, например:



Во-вторых, диспропорционирование  $C_1$ -соединений, при котором эти соединения служат как донорами, так и акцепторами электронов, например:



И, наконец, в-третьих, декарбоксилирование (диспропорционирование) ацетата:



Все метаногены способны образовывать метан из  $CO_2$  и  $H_2$ , но основную часть природного метана образуют представители двух родов: *Methanosarcina* и *Methanotrix* в результате диспропорционирования ацетата (рис. 3.10).

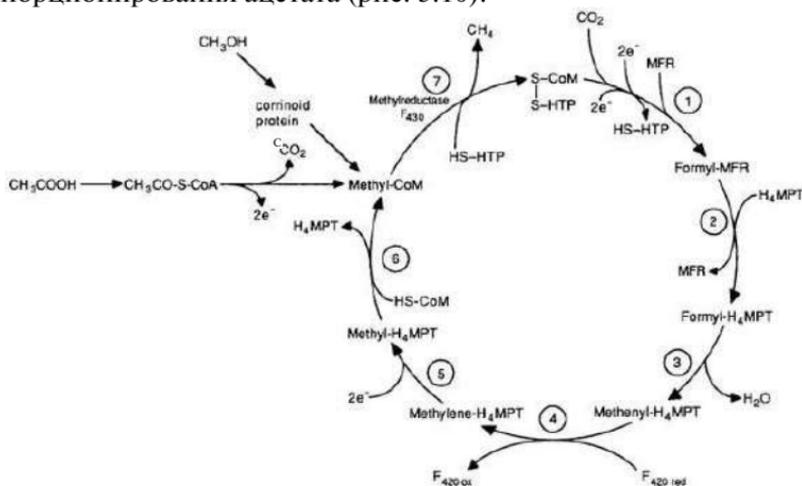


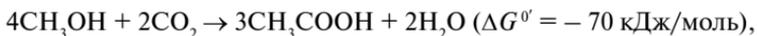
Рис. 3.10. Обобщенная схема метаногенеза

Источник: Rouvière et al., 1988 с изменениями

Процесс восстановления  $\text{CO}_2$  в метан складывается из семи этапов, не считая восстановления окисленных коферментов гидрогеназами. В этих процессах участвует семь новых коферментов, встречающихся только у архей: метанофуран (MFR), тетрагидрометанооптерин ( $\text{H}_4\text{MPT}$ ), кофермент  $\text{F}_{420}$  ( $\text{F}_{420}$ ), кофермент М (CoM), кофермент В (НТР), 5-гидроксibenзимидазол-гидроксикобамид (входящий в корриноидный белок) и кофермент  $\text{F}_{430}$  ( $\text{F}_{430}$ ). Из них только три ( $\text{H}_4\text{MPT}$ ,  $\text{F}_{420}$  и корриноид) сходны по строению с соответствующими коферментами бактерий и эукариот.

Запасание энергии в процессе метаногенеза осуществляется путем трансформации ТЭГ протонов (формирующегося, по-видимому, на этапе восстановления дисульфидной связи  $\text{CoM-S-S-HTR}$ ), а также за счет ТЭГ ионов натрия (возникающего в процессе декарбоксилирования ацетата и превращающегося в ТЭГ протонов посредством системы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипорта) в АТР с помощью  $\text{H}^+$  транслоцирующей АТРазы.

Термин *ацетогены (гомоацетогены)* используют для обозначения физиологической группы облигатно анаэробных бактерий, использующих механизм восстановительного синтеза ацетил-СоА по пути Вуда–Льюнгдала (рис. 3.11) из двух  $\text{C}_1$ -фрагментов, чаще всего из двух молекул  $\text{CO}_2$ . Другими предшественниками могут служить метанол и окись углерода:



Ряд ацетогенов могут использовать и многоуглеродные соединения (сахара и даже продукты деградации лигнина), расщепляя их до одноуглеродных предшественников ацетата

К ацетогенам относится весьма гетерогенная группа в основном грамположительных бактерий, в частности, представители родов: *Acetobacterium*, *Butyrobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Syntrophococcus* и др.

При стандартных условиях образование ацетата из двуокиси углерода и водорода обеспечивает выход 1 моль АТР/моль ацетата.

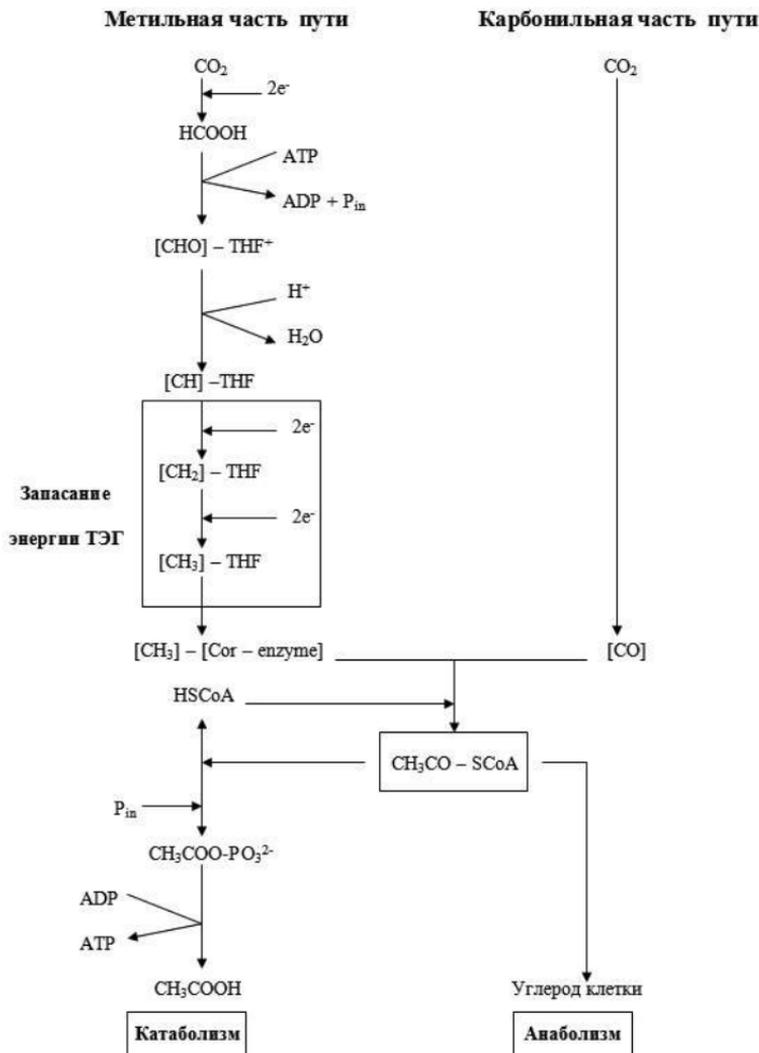


Рис.3.11. Схема ацетогенеза по пути Вуда–Льюнгдала

Метильная часть пути, включающая фолат-зависимый метаболизм одноуглеродных соединений, встречается у многих организмов (от бактерий до животных) и воспроизводится также у метаногенов (но с участием метаноптертинов). Карбонильная часть пути является уникальной для ацетогенов, метаногенов и сульфатредукторов; THF – тетрагидрофолат, Cor-enzyme – корриноидный фермент, HSCoA – кофермент А.

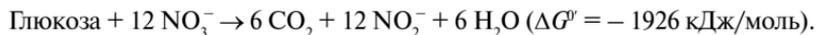
Однако в природных условиях концентрация молекулярного водорода недостаточна для обеспечения энергетических потребностей клетки, поэтому основным способом запасаения энергии является анаэробное дыхание. АТФ образуется путем трансформации ТЭГ протонов или ионов натрия с участием электронтранспортной цепи, включающей цитохромы типа *b*. При наличии в среде нитратов многие ацетогенные бактерии переключаются на более энергетически выгодное нитратное дыхание.

**Нитратное дыхание.** Существует два пути этого дыхания, в которых используется один и тот же исходный субстрат, но образуются разные конечные продукты.

Первый путь, получивший название *аммонификация*, приводит к восстановлению нитрата до аммония с участием восстановленного  $\text{NAD(P)H}^1$ .

Следует различать аммонификацию *диссимилиационную (дыхательную)* (собственно нитратное дыхание) и *ассимиляционную*, после которой аммоний используется для биосинтеза азотсодержащих веществ клетки. Ферменты ассимиляционной аммонификации локализованы в цитоплазме, тогда как диссимилиационная осуществляется с участием ферментов, связанных с цитоплазматической мембраной или сосредоточенных в периплазме. У прокариот встречаются оба типа аммонификации, а среди эукариот к ассимиляционной аммонификации способны только растения и грибы.

При диссимилиационной аммонификации (например, у энтеробактерий и стафилококков)  $\text{NADH}$ , образующийся в процессе гликолиза, восстанавливает нитрат в нитрит с участием мембранной редуктазы, при этом генерируется энергия по хемиосмотическому механизму (за счет трансформации ТЭГ протонов):



Восстановление нитрита до аммония не приводит к генерированию энергии, если используется цитоплазматическая нитриредуктаза. Однако у некоторых бактерий (*Wolinella succinogenes*) этот процесс катализируется мембранным ферментом и вносит вклад в запасаение энергии путем трансформации ТЭГ протонов.

---

<sup>1</sup> В отечественной литературе аммонификацией часто называют процесс высвобождения аммиака из состава органических соединений, например белков.

Второй путь, называемый *денитрификацией*, обычно завершается образованием газообразного азота. На начальном этапе обоих процессов нитрат восстанавливается до нитрита. Образующийся газообразный азот в дальнейшем может фиксироваться *азотфиксаторами* с образованием аммония, а последний снова превращается в нитрат под действием *нитрифицирующих бактерий*. Таким образом осуществляется круговорот азота (рис. 3.12).

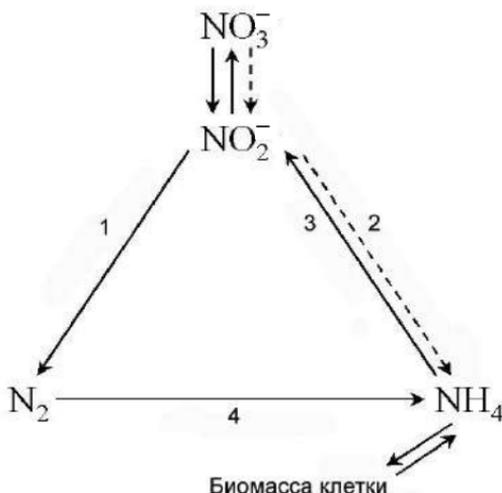


Рис.3.12. Схема круговорота азота: 1 – денитрификация; 2 – аммонификация; 3 – нитрификация; 4 – азотфиксация

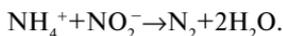
К денитрификации способны, главным образом, прокариоты (как грамположительные и грамотрицательные бактерии, так и археи). Хотя для некоторых грибов описана способность восстанавливать нитрат до окиси азота, значение этого процесса для роста убедительно не доказано.

подавляющее большинство денитрификаторов способны также к аэробному дыханию, причем кислород (если его уровень не лимитирован) является предпочтительным конечным акцептором электронов по сравнению с нитратом.

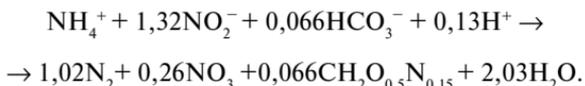
Денитрификация – это многостадийный процесс, в котором участвуют четыре типа ферментов: нитратредуктаза (Nar), нитритредуктаза (Nir), редуктаза окиси азота (Nor) и редуктаза закиси азота (Nos) (рис. 3.13).



(от англ. ANAMMOX – anaerobic ammonium oxidation). Базовым уравнением процесса является следующее:



Молярное отношение нитрита и аммония составляет 1:1, но, учитывая потребность микроорганизмов в фиксации углерода, общее стехиометрическое уравнение процесса имеет вид:



Бактерии, проводящие процесс АНАММОКС, относятся к порядку *Planctomycetales*. Это грамтрицательные бактерии четырех родов: *Candidatus «Brocadia»*, *Candidatus «Kuenenia»*, *Candidatus «Scalindua»*, а также *Candidatus «Anammoxoglobus»*.

ANAMMOX-бактерии, как большинство бактерий *Planctomycetes*, не содержат пептидогликана и имеют клеточную стенку, состоящую из белка.

Клетка имеет сложную компартментализацию (рис. 3.14 и 3.15).

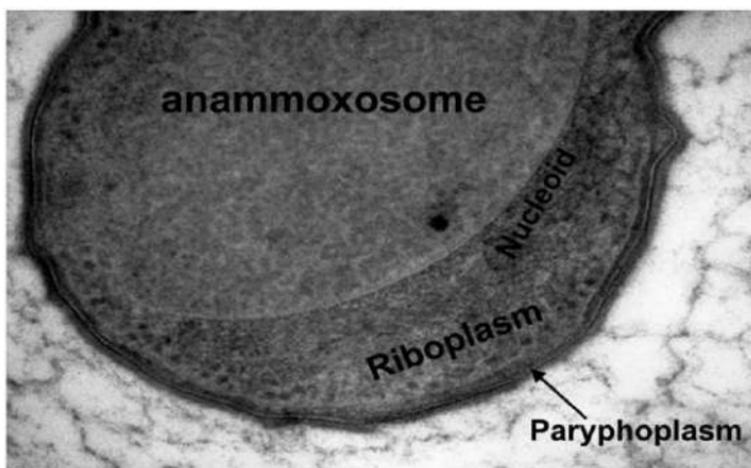


Рис. 3.14. Электронная микрофотография бактерии *Candidatus Brocadia anammoxidans*

Источник: König, E., Schlesner, H. & Hirsch, P. Cell wall studies on budding bacteria of the Planctomyces // Pasteuria group and on a Prosthecomicrobium sp. Archives of Microbiology. 1984. Vol. 138. P. 200–205.



Рис. 3.15. Схема строения клетки ANAMMOX-бактерии

Источник: Lindsay, M.R., Webb, R., Strous et al. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell // Archives of Microbiology. 2001. Vol. 175. 413–429.

Интрацитоплазматическая мембрана окружает основную часть клетки. Клеточная стенка данных бактерий, в отличие от других грамотрицательных бактерий, у которых она окружена одной мембраной с внешней и одной мембраной с внутренней стороны, имеет две мембраны с внутренней стороны и ни одной с внешней стороны. Одна из этих мембран близко примыкает к белковой клеточной стенке. Эта мембрана называется цитоплазматической — из-за обнаружения РНК в «перифоплазматическом» отделе, находящемся ниже данной мембраны.

Следующая мембрана, расположенная глубже, называется интрацитоплазматической. Таким образом, перифоплазма — это часть клетки, отделенная цитоплазматической мембраной с одной стороны и интрацитоплазматической — с другой. В ANAMMOX-бактериях часть клетки, окруженная интрацитоплазматической мембраной, содержит еще один отдел, окруженный одной двухслойной мембраной. Этот отдел клетки называется анамоксозомой, и именно здесь проходят реакции катаболизма. Анамоксосома занимает от 1/3 до 2/3 объема клетки.

Таким образом, цитоплазма бактерии разделена на три отдела, разделенные одинарными двухслойными мембранами: 1) внешний отдел, или перифоплазма, определяемая как краевое кольцо, ограниченное с внешней стороны цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, а с внутренней — интра-

цитоплазматической мембраной; 2) рибоплазма, содержащая нуклеоид; 3) внутренняя часть, не содержащая рибосом, окруженная специальной мембраной – анаммоксозома.

ANAMMOX-бактерии содержат большое количество необычных мембранных липидов, в составе которых были обнаружены уникальные химические структуры. Они содержат одну, две или обе различные кольцевые структуры, получившие название X и Y (рис. 3.16).

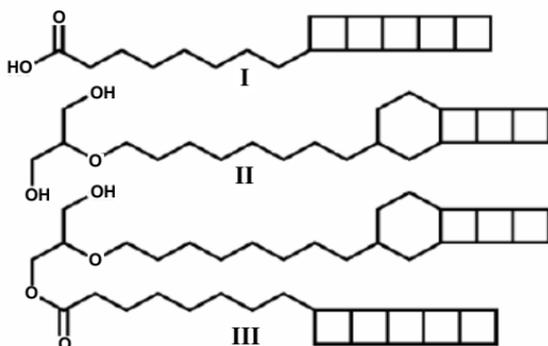


Рис. 3.16. Химическая структура мембранных липидов ANAMMOX-бактерий:

I – содержащие жирную кислоту кольцевые структуры Y; II – моноалкил глицерол эфирсодержащие кольцевые структуры X; III – содержащие обе кольцевые структуры X и Y

Источник: Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane / Sinninghe Damsté, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., et al. // Nature. 2002. Vol. 419. P. 708–712.

Данные уникальные липиды составляют около 30% от общего содержания липидов в клетке бактерии *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Кроме клеток ANAMMOX-бактерий, данные липиды нигде в природе не найдены, в связи с чем возникает вопрос об их функциональном значении. Возможно, они помогают формировать очень тонкую мембрану для защиты цитоплазмы от токсических промежуточных продуктов реакций, протекающих в анаммоксосоме. Нитрит восстанавливается посредством нитритредуцирующего фермента до гидроксилamina. Гидроксиламин с помощью неизвестного пока фермента – гидразингидролазы – реагирует с донором электро-

нов — аммонием, что приводит к образованию газообразного азота. Все ключевые ферменты процесса локализованы внутри анаммоксосомы — специализированного интрацитоплазматического компартмента, окруженного мембраной, содержащей ладдерановые («лестничные») липиды с циклобутановой структурой. Эта мембрана слабо проницаема для протонов и промежуточных продуктов данного процесса, что облегчает запасание энергии в виде протонного градиента и предохраняет остальную часть клетки от токсичных веществ (например, гидразина).

Схема биохимических реакций приведена на рис. 3.17.

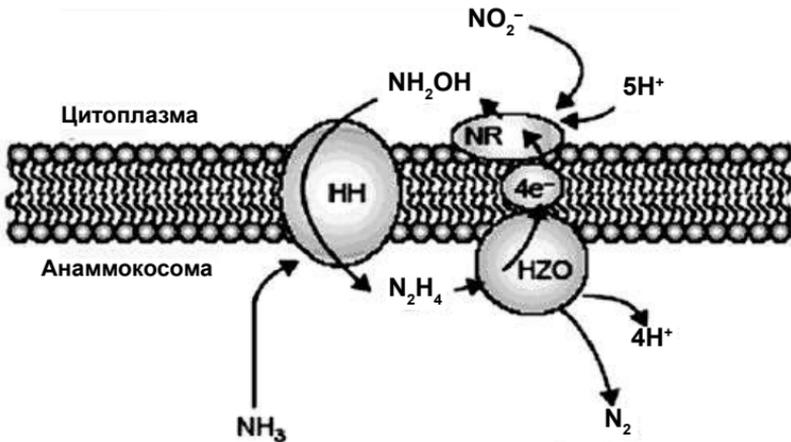


Рис. 3.17. Механизм анаэробного окисления аммония:

NR — нитрит-восстанавливающий фермент (предполагаемый продукт —  $\text{NH}_2\text{OH}$ ); HH — фермент (гидразингидролаза), образующий гидразин из аммония и гидроксиламина; HZO — фермент, окисляющий гидразин (возможно, эквивалентен гидроксиламинооксидоредуктазе)

Источник: [http://www.nioz.nl/nioz\\_nl/fb7bc8c70b02a22a459dee41c83645cc.php](http://www.nioz.nl/nioz_nl/fb7bc8c70b02a22a459dee41c83645cc.php), с изменениями.

Особый интерес представляет участие данных ферментов в расщеплении гидразина — высокотоксичного компонента ракетного топлива.

Согласно данной биохимической модели в реакции ANAMMOX устанавливается протонный градиент на мембране, разделяющей два компартмента клеток бактерий — рибо-

плазму и внутреннее пространство анаммоксосомы, где и накапливаются протоны. Результатом действия этого механизма является образование электрохимического протонного градиента, направленного из анаммоксосомы в рибоплазму.

Роль указанного процесса в глобальном цикле азота достаточно велика. Например, в мировом океане таким путем образуется до 50% молекулярного азота (рис. 3.18).

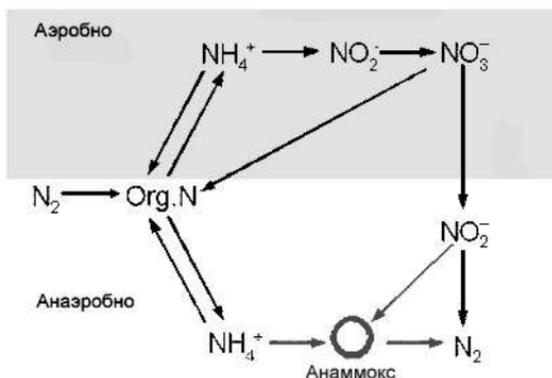


Рис. 3.18. Круговорот азота в мировом океане (с включением анаэробного «стока» анаммокс)

Источник: [http://www.nioz.nl/nioz\\_nl/fb7bc8c70b02a22a459dee41c83645cc.php](http://www.nioz.nl/nioz_nl/fb7bc8c70b02a22a459dee41c83645cc.php) с изменениями.

В результате в анаэробных зонах океана накапливается гораздо меньше аммония, чем это следует из стехиометрии реакций гетеротрофной денитрификации.

Процессы анаэробного окисления аммония широко используются при очистке сточных вод ряда промышленных производств. Их преимущество по сравнению с другими процессами очистки сточных вод состоит в ряде технологических преимуществ, меньших энергетических затратах, значительном снижении выделения в атмосферу двуокси углерода.

**Фумаратное дыхание.** Этот тип энергетического метаболизма можно рассматривать как переходный этап от брожения к анаэробному дыханию. В нем участвует фумаратредуктазный комплекс, обеспечивающий сопряжение процесса восстановления фумарата в сукцинат с экскрецией протонов через цитоплазматическую мембрану, в результате чего создается ТЭГ протонов, используемый на энергетические нужды клетки непосредственно или после трансформации в АТФ (см. рис. 3.6, *E.coli*).

*Другие виды анаэробного дыхания.* В качестве акцепторов электронов в анаэробном дыхании могут также использоваться ионы трехвалентного железа (*Geobacter metallireducens*, *Shewanella putrefaciens*) и органические вещества: диметилсульфоксид, триметил-N-оксид (*E.coli*), а также органические хлорпроизводные (метахлорбензоат и другие ароматические метахлорпроизводные, перхлорэтилен) (*Dehalococcoides ethenogenes*). В последнем случае процесс называется восстановительным дехлорированием.

В энергетических процессах типа брожения для получения энергии используются метаболические превращения органических веществ в отсутствие внешних акцепторов электронов. Поскольку молекулярный кислород в данных процессах не участвует, знаменитый французский микробиолог Луи Пастер, впервые подробно изучивший этот тип микробного метаболизма, назвал его «жизнью без воздуха».

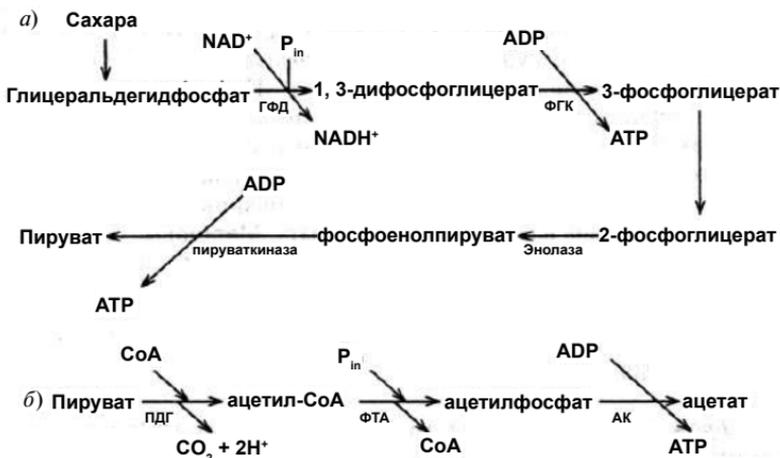
Запасание энергии при брожениях происходит путем либо *субстратного фосфорилирования* с образованием макроэнергетических соединений (АТР, РЕР), либо формирования ТЭГ за счет экскреции неорганических ионов или кислых продуктов брожения. Несмотря на большое разнообразие типов брожений, которые обычно получают название по главному конечному продукту (спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, пропионовокислое, муравьинокислое, ацетобутиловое и т.д.), субстратное фосфорилирование осуществляется в ограниченном количестве типовых реакций (рис. 3.19).

Наиболее часто используемыми в брожениях субстратами являются сахара (гексозы и пентозы). На первом этапе, как правило, они подвергаются фосфорилированию с образованием фосфорных эфиров (исключением являются некоторые археи, способные расщеплять сахара без предварительного фосфорилирования).

Существуют четыре главных метаболических пути превращения фосфорных эфиров сахаров в пируват или пируват + ацетилфосфат:

1) *Эмбдена–Мейергофа* (или фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолазный). В этом случае из одной молекулы гексозы образуются две молекулы пирувата и две молекулы АТР (из АDP и неорганического фосфата) (рис. 3.20, левая часть);

## Реакции окисления:



## Реакции расщепления, сопряженные с фосфорилированием:

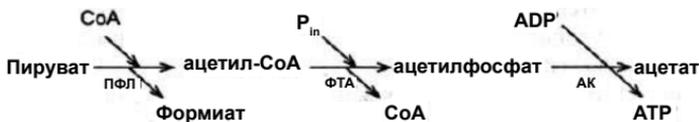


Рис. 3.19. Основные реакции субстратного фосфорилирования в брожениях

2) *Энтнера–Дудорова* (или 2-дегидро-3-дезоксиглюкоконат-альдолазный). В этом случае из одной молекулы глюкозы образуется только одна молекула АТФ, поэтому данный путь, как правило, используется для микроорганизмов, которые способны к анаэробному дыханию, позволяющему получить дополнительное количество АТФ (рис. 3.20, правая часть);

3) *фосфокетолазный* (или ксилулозо-5-фосфат-фосфокетолазный), который иногда называют пентозофосфатным. Этот путь играет важную ассимиляционную роль, так как обеспечивает биосинтез пентоз (рис. 3.21);

4) особый (у *Bifidobacterium bifidum*), представляющий собой комбинацию реакций трансальдолазного и кетолазного путей, приводящий к образованию из двух молекул глюкозы, двух молекул пирувата и трех молекул ацетилфосфата (рис. 3.22).



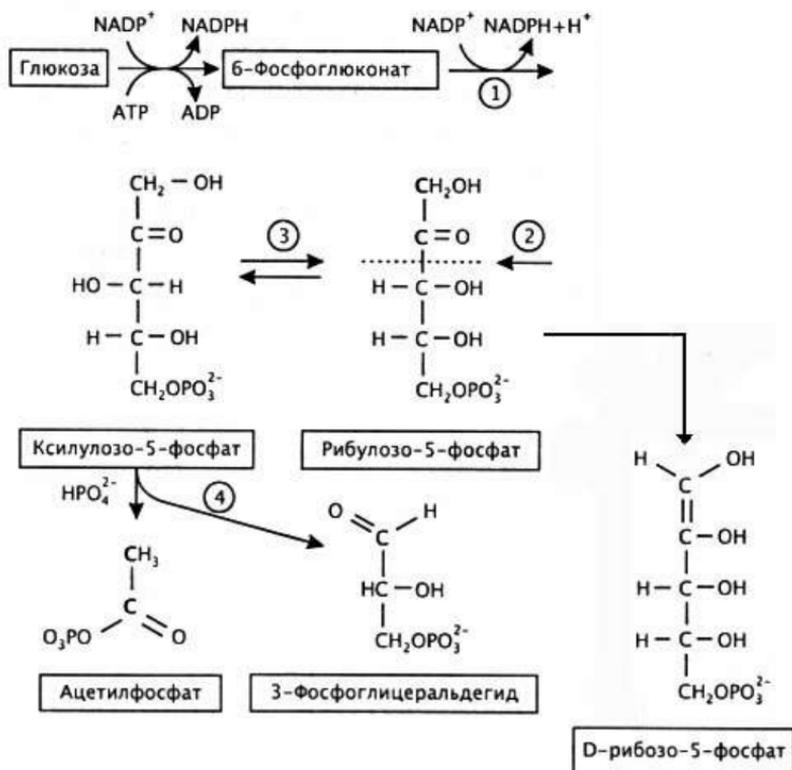


Рис. 3.21. Фосфокетолазный путь:

1 – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (декарбокксилирующая); 2 – рибозо-5-фосфат-изомераза; 3 – ксилулозо-5-фосфат-эпимераза; 4 – фосфокетолаза-2, использующая тиаминпирофосфат в качестве простетической группы [7]

При *спиртовом брожении* происходит восстановление ацетальдегида в этанол с участием алкогольдегидрогеназы. Ацетальдегид может быть получен двумя способами: 1) восстановлением ацетил-СоА (у молочнокислых бактерий, кластридий и энтеробактерий) или 2) декарбокксилированием пирувата, полученного у дрожжей (путь Эмбдена–Мейергофа) или у *Zytoponas* (путь Энтнера–Дудорова).

*Маслянокислое брожение* осуществляется кластридиями *Clostridium pasteurianum* (путь Эмбдена–Мейергофа) с последующим образованием из ацетил-СоА бутирил-СоА.



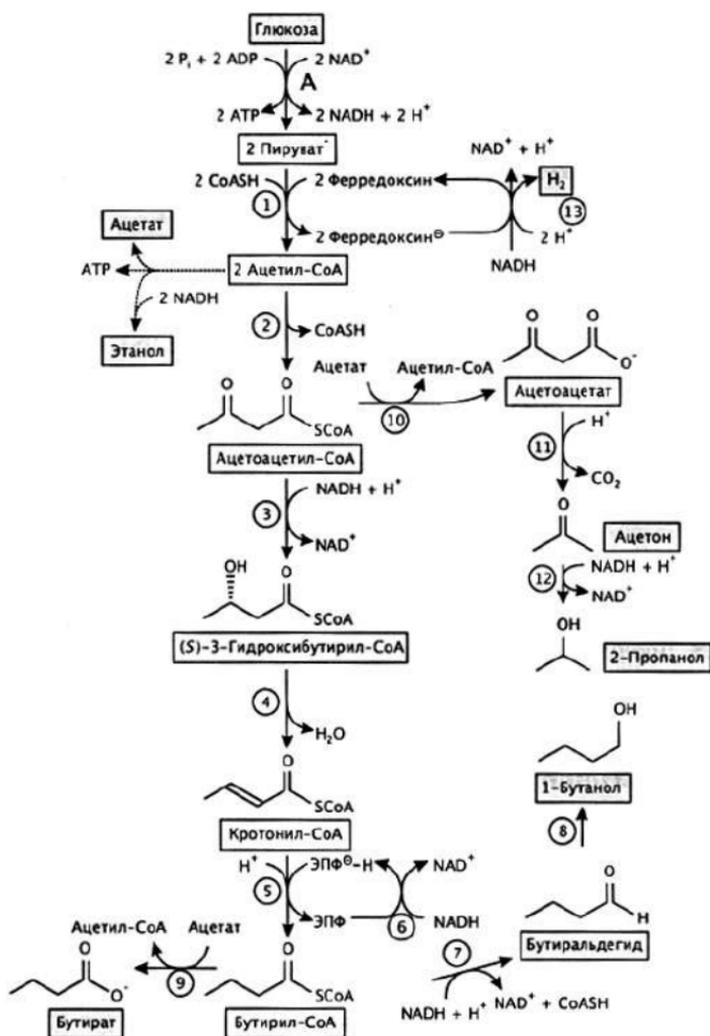


Рис. 3.23. Схема брожения у клостридий: А – путь Эмбдена–Мейергофа; 1 – пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза; 2 – ацетил-СоА-ацетил-трансфераза; 3 – 3-гидроксibuтирил-СоА-дегидрогеназа; 4 – крото-нил-СоА-гидратаза; 5 – гидроксibuтирил-СоА-дегидрогеназа; 6 – диа-фoраза; 7 – бутиральдегиддегидрогеназа; 8 – 1-бутанолдегидрогеназа; 9 – бу-тират:СоА-трансфераза; 10 – ацетоацетат:СоА-трансфераза; 11 – ацето-ацетатдекарбоксилаза; 12 – 2-пропанолдегидрогеназа; 13 – NADH: ферредоксин-оксидоредуктаза + гидрогеназа; ЭПФ – электронпере-носящий флавопротеин [7]

Основными исходными субстратами для *пропионовокислого брожения* служат глюкоза или лактат (у широкого круга микроорганизмов, типичными представителями которых являются бактерии рода *Propionibacterium*). Однако пропионовая кислота может также образоваться из глицерина, сукцината и некоторых аминокислот (аланина, серина, цистеина, треонина, метионина и глутамата).

Наряду с субстратным фосфорилированием запасание энергии в процессах брожения может осуществляться путем формирования ТЭГ катионов. Так, некоторые облигатно анаэробные бактерии, осуществляющие пропионовокислое брожение с образованием *метилмалонил-CoA* (*Propionibacterium modestum*), способны формировать градиент ионов  $\text{Na}^+$  ( $\Delta p\text{Na}^+$ ) в процессе декарбоксилирования этого соединения в *пропионил-CoA* (рис. 3.24).

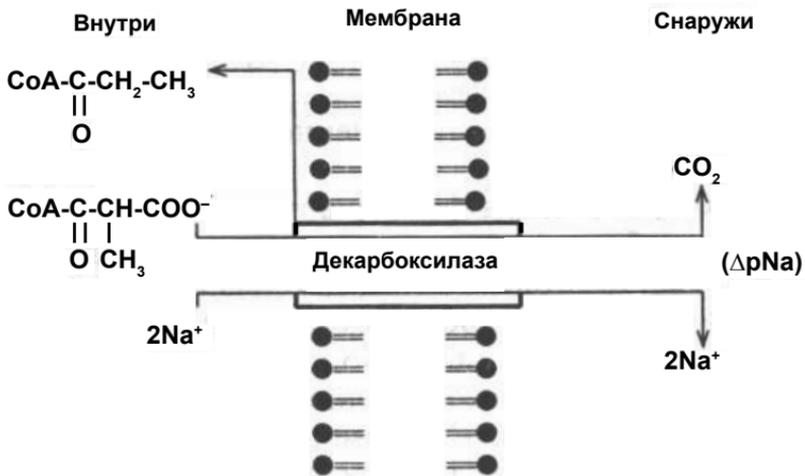


Рис. 3.24. Формирование  $\Delta p\text{Na}^+$  за счет декарбоксилирования (на примере *Propionibacterium modestum*)

Другим примером служит формирование градиента  $\text{H}^+$  ( $\Delta p\text{H}$ ) в процессе экскреции кислых продуктов брожения (молочной и других кислот). Вместе с анионом кислоты через мембрану транслоцируются два протона (так называемый «симпорт»).

Образующийся в результате ТЭГ протонов используется на энергетические нужды клетки или преобразуется в АТФ (рис. 3.25).

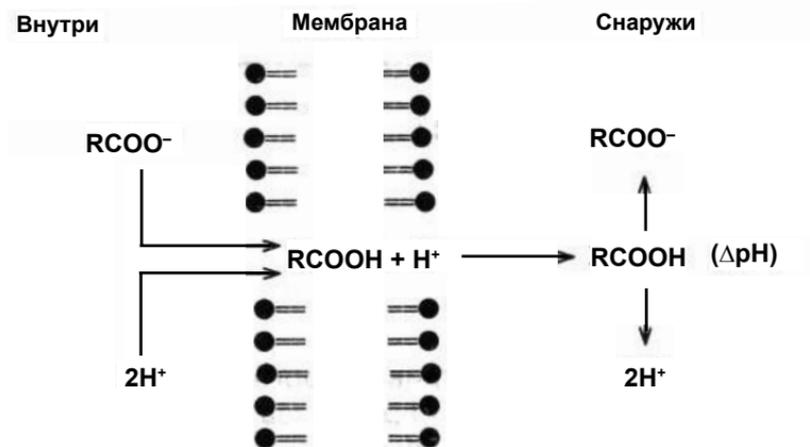


Рис. 3.25. Формирование  $\Delta\text{pH}$  за счет экскреции органических кислот (на примере *Streptococcus cremoris*)

## 3.4. ФОТОСИНТЕЗ

### 3.4.1. ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА.

#### ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ

До сих пор мы рассматривали организмы, которые для обеспечения конструктивных процессов используют энергию химических связей органических или неорганических веществ. Но есть большая группа организмов, у которых для этих же целей используется энергия света. Данный процесс получил название «фотосинтез». Итак, *фотосинтез* – это процесс использования энергии светового излучения для построения живого вещества. Образование АТФ в процессе фотосинтеза называют *фотофосфорилированием*.

В настоящее время следует различать два типа фотосинтеза: *хлорофильный*, в котором светопоглощающим пигментом служат разные типы хлорофиллов, и *бесхлорофильный*, в котором в качестве светопоглощающих пигментов используется бактериородопсин и сходные с ним пигменты.

Фотосинтез состоит из светозависимых («световых») и светонезависимых («темновых») процессов. В световых процессах (рис. 3.26) происходит расщепление воды (у растений и некоторых цианобактерий) или другого донора электронов (у бактерий) с образованием электронов, протонов и кислорода (в случае «кислородного» фотосинтеза).



Рис. 3.26. Схема процессов фотосинтеза:

X и X<sup>-</sup> — компоненты цепи переноса электронов, служащие восстановителями при фиксации CO<sub>2</sub>; P<sub>i</sub> — неорганический ортофосфат. Природа донора электронов зависит от вида организма

Для фиксации углекислоты окислительно-восстановительный потенциал системы восстановителей должен быть ниже -400 мВ (т. е. потенциала системы CO<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>O, где CH<sub>2</sub>O — обобщенная формула органических веществ — первичных продуктов фотосинтеза). Обычные доноры электронов, используемые в фотосинтезе, не обладают столь низким потенциалом, поэтому для восстановления хлорофилла необходим *обратный перенос электронов* от молекулы пигмента (хлорофилла) за счет энергии света. Донор электронов затем восполняет их дефицит в молекуле пигмента. Другой участок, на котором затрачивается энергия света, — ресинтез АТФ, расходуемого для активирования первичных продуктов фиксации CO<sub>2</sub>. Уравнение фотосинтеза в общем виде выглядит следующим образом :



В *высших растениях и цианобактериях* донором электронов является *вода* (A = O), из которой освобождается кислород. Фотосинтез поэтому называется «кислородным», или *оксигенным*.

Основными типами метаболизма у этих организмов являются либо *фотолитоавтотрофия* (у растений и некоторых цианобактерий), либо *фотолитогетеротрофия* (у других цианобактерий).

В ряде фототрофных прокариот (зеленых и пурпурных серных бактерий) донорами электронов является *сероводород* (или сера) ( $A = S$ ). В некоторых серных и несерных пурпурных бактериях донорами электронов может служить *молекулярный водород*. Наконец, несерные пурпурные бактерии используют в качестве доноров электронов *органические вещества*.

Более подробный список доноров электронов при фотосинтезе приведен в табл. 3.3.

Таблица 3.3

### Характеристика основных типов фотосинтетических пигментов и процессов

Представители	Филогенетическая группа	Природа пигментов	Доноры электронов	Первичный акцептор электронов	Путь фиксации $CO_2$
Несерные пурпурные бактерии	$\alpha$ - и $\beta$ -протеобактерии	Бактериохлорофиллы <i>a</i> или <i>b</i>	Органические вещества, $H_2$ , $Fe^{2+}$ , $H_2S$ (низкие концентрации)	Хинон	Цикл Кальвина
Серные пурпурные бактерии	$\gamma$ -протеобактерии	Бактериохлорофиллы <i>a</i> или <i>b</i>	$H_2S$ и др., $H_2$ , некоторые органич. в-ва	Хинон	Цикл Кальвина
Heliobacteria	Фирмакуты	Бактериохлорофилл <i>g</i>	Органические вещества	Ферредоксин	Цикл Кальвина
Серные зеленые бактерии	Тип <i>Chlorobi</i>	Бактериохлорофиллы <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i>	$H_2S$ , $S_2O_3^-$ , $H_2$	Ферредоксин	Обратный ЦТК
Несерные зеленые бактерии	Тип <i>Chloroflexi</i>	Бактериохлорофиллы <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i>	Органические вещества, $H_2$ , $H_2S$	Хинон	Гидроксипропионатный цикл
Цианобактерии	Тип <i>Cyanobacteria</i>	Фикобилины, хлорофиллы <i>a</i> или <i>b</i>	$H_2O$	Хинон (фотосистема I), ферредоксин (фотосистема II)	Цикл Кальвина

Следует напомнить, что у растений хлорофилл локализован в специальных внутриклеточных органеллах (хлоропластах), а у прокариот — в субклеточных структурах, происходящих из цитоплазматической мембраны (табл. 3.4 — отличия про- и эукариот).

Таблица 3.4

### Пути фиксации CO<sub>2</sub> у прокариот

Путь фиксации	Микроорганизмы-представители	Тип (филум)
Цикл Кальвина	<i>Anabaena cylindrica</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> <i>Methanococcus jannaschii</i>	Cyanobacteria Proteobacteria Proteobacteria Euryarchaeota
Восстановительный цикл трикарбоновых кислот	<i>Chlorobium lumicola</i> <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i> <i>Aquifex pyrophilus</i> <i>Thermoproteus neutrophilus</i>	Chlorobi Proteobacteria Aquificae Crenarchaeota
Восстановительный ацетил-СоА путь	<i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> <i>Methanococcus jannaschii</i> <i>Ferroglobus placidus</i>	Firmacutes Proteobacteria Euryarchaeota Euryarchaeota
Гидрокси-пропионатный цикл	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> <i>Sulfolobus metallicus</i>	Chloroflexi Crenarchaeota

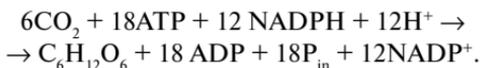
Источник: Menendez et al., 1999 с изменениями.

Таким образом, фотосинтез растительного и бактериального типов различается тремя основными показателями: 1) природой пигментов (хлорофилл или бактериохлорофиллы, а также бактериородопсин) и их локализацией в клетке; 2) природой доноров электронов; 3) способностью к выделению кислорода.

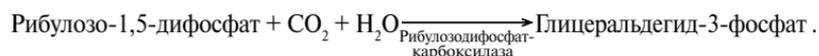
#### 3.4.2. Путь углерода в фотосинтезе. Цикл Кальвина

Включение CO<sub>2</sub> в конструктивный метаболизм у фототрофов и некоторых автотрофных бактерий осуществляется за счет последовательности реакций, называемой *циклом Кальвина*, или *циклом автотрофной фиксации углекислоты*. Этот цикл сходен

с пентозофосфатным циклом катаболизма сахаров у хемоорганогетеротрофов. Суммарное уравнение выглядит следующим образом:



Для синтеза одной молекулы глюкозы требуется шесть «оборотов» цикла (фиксация шесть молекул  $\text{CO}_2$ ). В цикле Кальвина по сравнению с пентозофосфатным циклом для регенерации акцептора  $\text{CO}_2$  необходимы две дополнительные реакции:



Дальнейшая последовательность реакций представляет собой «обращение» гликолиза. В качестве восстановителя при этом используется NADPH, что приводит к образованию глюкозы (рис. 3.27).

У некоторых фототрофных организмов (зеленые серные и несерные бактерии) фиксация  $\text{CO}_2$ , как показано в табл. 3.3, осуществляется по «обращенному» циклу трикарбоновых кислот, так называемому *циклу Арнона*, или с использованием *гидроксипропионатного цикла*. Другие пути фиксации углекислоты у фототрофных бактерий перечислены в табл. 3.4.

У растений начальные ферменты цикла Кальвина сосредоточены в *хлоропластах*. В клетках некоторых фототрофных бактерий рибулозодифосфаткарбоксилаза найдена в карбоксисомах (см. табл. 3.2), хотя не исключено, что там она пребывает в латентном состоянии.

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

### 3.4.3. БЕСХЛОРОФИЛЛЬНЫЙ ФОТОСИНТЕЗ

Особый тип фотосинтеза — без участия хлорофилльных пигментов — обнаружен у *экстремально галофильных бактерий*.

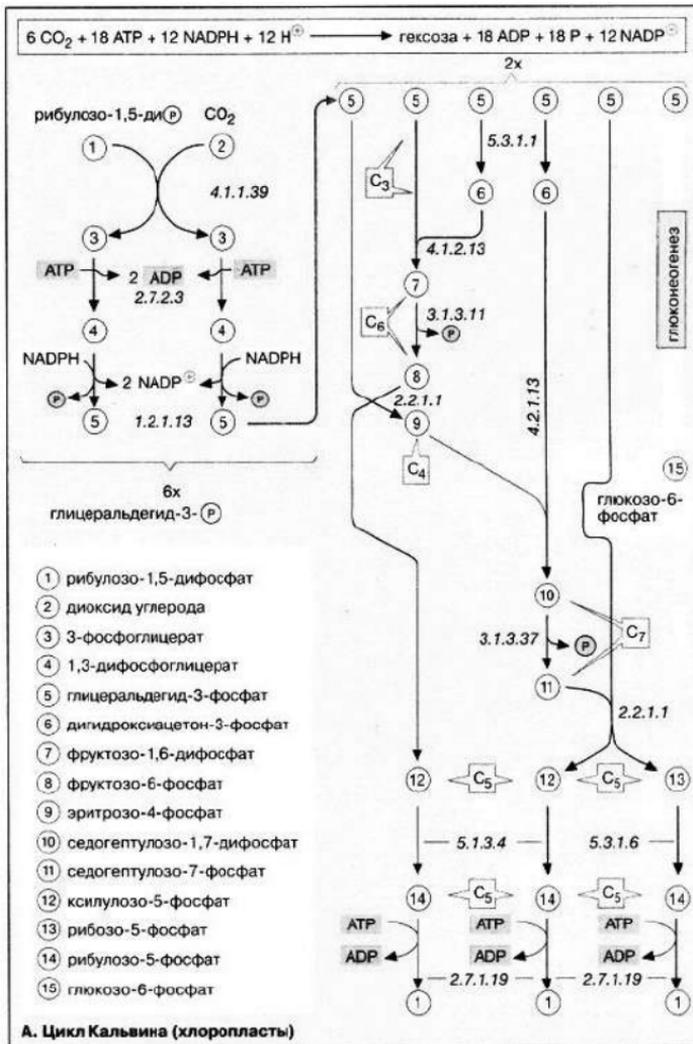


Рис. 3.27. Цикл Кальвина в хлоропластах

Источник: [3, 395]

Это единственный тип фотосинтеза, не включающий цепь переноса электронов. Клетки галобактерий содержат особый белок – *бактериородопсин* (сходный со зрительным родопсином животных), включающий каротиноид – ретиналь (альдегидную форму витамина А). Совместно с фосфолипидами бактериородопсин формирует так называемые *фиолетовые мембраны*, которые в виде

бляшек покрывают до 50% поверхности клеток. Под действием света бактериородопсин транслирует протоны из цитоплазмы в окружающую среду, создавая протонный ТЭГ, который посредством  $H^+$ -АТФсинтетазы преобразуется в АТФ (рис. 3.28).

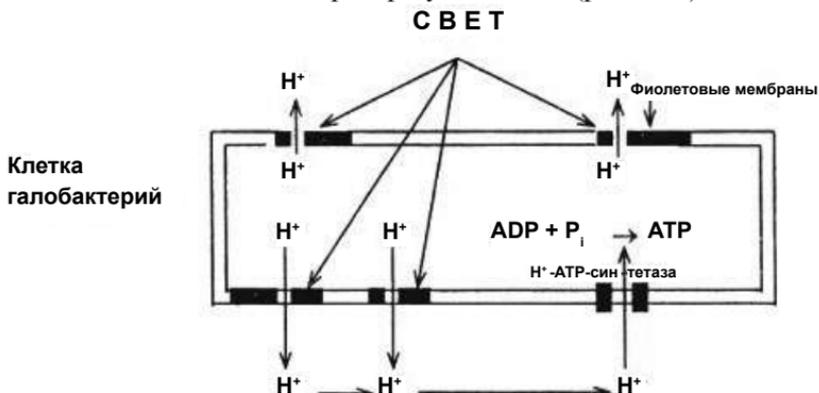


Рис. 3.28. Схема бесхлорофильного фотосинтеза в клетках галобактерий (показаны «бляшки» фиолетовых мембран, содержащих бактериохлорофилл, который является светозависимой протонной «помпой»)

В последнее время молекулярно-биологическими методами белок, аналогичный бактериородопсину (протеородопсин), обнаружен у морских  $\gamma$ -протеобактерий. Таким образом, бесхлорофильный фотосинтез может иметь значительно большее распространение в природе, чем считалось до сих пор.

#### 3.4.4. Фоторецепция

В отличие от фотосинтеза в процессе *фоторецепции* энергия света запасается не в виде макроэргических соединений или ТЭГ, а в виде информации, выражающейся в химических превращениях фоторецептора.

Далее эти изменения преобразуются либо в нервный импульс (в процессах зрения), либо в тот или иной вид сигнала (например, вызывающего появление индуктора или репрессора, регулирующих фенотипическое проявление генома). Чаще всего фоторецепторами являются каротиноиды (в родопсинах) или тетрапирролы (фитохром растений и др.). Иногда эту роль могут выполнять флавины (реакция на синий свет растений и грибов).

Известны попытки использования бактериородопсина в так называемой «бессеребряной» фотографии, где изображение проявляется за счет химических изменений фоторецептора при воздействии света, а также в других системах записи и хранения информации, в том числе для целей кибернетики, т.е. для разработки ЭВМ на основе новых типов носителей информации.

## 3.5. ПРОЦЕССЫ КОНСТРУКТИВНОГО МЕТАБОЛИЗМА

### 3.5.1. Взаимосвязь энергетических и конструктивных процессов в клетке

При рассмотрении этой проблемы нужно иметь в виду два обстоятельства:

1. В клетке на самом деле не существует резкого разграничения энергетических и конструктивных процессов. Как правило, в результате реакций катаболизма образуются такие промежуточные продукты, которые могут «подхватываться» ферментами анаболизма и использоваться для построения веществ клетки.

2. В живой клетке широко используется принцип организации биохимических процессов в виде *метаболических циклов*, когда исходный и конечный компоненты идентичны, и циклы могут функционировать неопределенно долгое время при условии *притока* субстратов и *оттока* продуктов. В соответствии с термодинамическими соображениями энергия, необходимая для биосинтеза какого-либо компонента клетки, как правило, должна быть больше, чем энергия, получаемая в результате его катаболизма. Однако «энергетические» субстраты, катаболизм которых дает больше энергии, чем необходимо для их ресинтеза, позволяют сформировать циклический механизм, позволяющий клетке функционировать подобно вечному двигателю.

Катаболические реакции обычно экзэргоничны, представляют собой окислительную деградацию веществ, поступающих из внешней среды или резервов клетки, а освобождающаяся энергия запасается в виде ТЭГ ионов или в форме макроэнергетических соединений (АТФ, РЕР и др., см. разд. 3.1).

В перераспределении потоков энергии, получающейся в результате катаболизма и затрачиваемой в процессе анаболизма, большое значение имеют никотинамидные коферменты: NAD и NADP. Восстановление NAD<sup>+</sup> происходит в процессах катаболизма, и окисление этого соединения может сопровождаться запасанием энергии в АТФ. Напротив, NADPH является источником восстановительных эквивалентов в биосинтетических реакциях, а его окисление служит движущей силой анаболизма. В поддержании равновесия между NADH и NADPH важную роль играет *трансгидрогеназная реакция*:



Взаимосвязь между теми реакциями, в результате которых энергия выделяется и может быть запасена в клетке, и теми, в которых она затрачивается на построение веществ клетки, удобнее всего рассмотреть на примере метаболизма сахаров, чаще всего выступающих в качестве энергодающих субстратов.

Рассмотрим пример, когда основным источником энергии и углерода служит глюкоза или содержащие глюкозу полисахариды (случай типичный для многих прокариот и эукариот). Последовательность протекающих реакций изображена на рис. 3.29.

Утилизация *полисахаридов* начинается с их гидролиза (1). Гидролиз с участием ферментов *амилаз* приводит к образованию *олигосахаридов* и свободных *сахаров*, которые с помощью *фосфорилаз* превращаются в фосфорные эфиры сахаров. В случае глюкозы это чаще всего глюкозо-6-фосфат, образование которого катализируется *гексокиназой* (2). Обратная реакция – синтез полисахаридов – типичный анаболический процесс, протекающий с затратой энергии. Суть процесса состоит либо в образовании *запасных веществ*, либо в синтезе *структурных полисахаридов* (например, компонентов клеточной стенки). В этих случаях промежуточно образуются продукты взаимодействия сахаров и нуклеотидов (например, *уридиндифосфат-глюкоза*). Фосфорилирование глюкозы – это первый этап *гликолиза* (3) (см. разд. 3.3, посвященный брожениям), в котором через промежуточное образование триозофосфатов синтезируется *пируват*. Он же получается и при функционировании пентозофосфатного цикла (4), или пентозофосфатного шун-

та, биосинтетическое значение которого состоит, в частности, в синтезе *пентоз* (5). Дальнейшие превращения пирувата приводят либо к синтезу *аланина* (6, чисто биосинтетический процесс), либо к образованию *ацетил-СоА*, «питающего» цикл трикарбоновых кислот (ЦТК, 7), значение которого рассмотрим подробнее чуть позже. При наличии готового аланина из него под действием соответствующей *дезаминазы* вновь образуется пируват, вступающий в катаболические процессы.



Рис. 3.29. Схема основных путей конструктивного метаболизма в клетке

Ацетил-СоА может служить исходным метаболитом для синтеза *жирных кислот* (8), являющихся необходимыми компонентами *липидов*. В свою очередь катаболизм липидов сопровождается их гидролизом с освобождением жирных кислот, которые далее могут подвергаться деградации до ацетил-СоА. Таким образом, ацетил-СоА находится в центре как катаболических, так и анаболических превращений многих субстратов (такие метаболиты, как ацетил-СоА, иногда называют «центроболитами»), в частности, углеводов и липидов.

Для завершения процессов окисления жирных кислот (до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ) необходимо также окислить ацетильные остатки, образующиеся в результате  $\beta$ -окисления (9), что и осуществляется в процессе функционирования цикла трикарбоновых кислот (ЦТК).

Представление о ЦТК (старое название «цикл Кребса») сформулировано американским биохимиком Г.А.Кребсом в 1937 г., получившим за эти исследования Нобелевскую премию (1953 г.). ЦТК выполняет две важные задачи: 1) полное окисление многих субстратов, что обеспечивает клетку энергией; 2) получение промежуточных продуктов для синтеза ряда клеточных компонентов, в частности аспарагиновой и глутаминовой кислот в результате прямого аминирования кетокислот: оксалоацетата и 2-оксоглутарата (10 и 11 на схеме). Из них (а также аланина) путем переаминирования могут быть получены многие другие аминокислоты и в конечном счете — белки.

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

Завершая рассмотрение схемы на рис. 3.29, отметим, что ЦТК вносит вклад в синтез всех важнейших биополимеров клетки, в том числе и в синтез нуклеиновых кислот, через образование пиримидинов (12) и пуринов. Синтез пуринов осуществляется при участии пентозофосфатного шунта (их предшественник — рибозо-5-фосфат), но часть атомов углеродного скелета пуринов происходит из аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой, а также формиата. Сахарная часть нуклеотидов создается из пентоз (13), также образующихся в пентозофосфатном цикле. Пиримидины могут использоваться и в энергетических процессах; их катаболизм протекает через образование метилмалонил- $\text{CoA}$ , включающегося в конечном счете в ЦТК (14).

### 3.5.2. УСТАНОВЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РЕАКЦИЙ В МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЯХ

Как и в случае катаболических путей, последовательность реакций конструктивного метаболизма можно устанавливать с помощью специфических ингибиторов (если они существуют). Для этого необходима ферментная система, получаемая посредством разрушения клеток (для исключения барьера проницаемости для субстратов и ингибиторов), в которой могла бы протекать изучаемая последовательность реакций. Введение в такую систему специфического ингибитора, подавляющего активность фермента, катализирующего одну из стадий процесса, приводит к накоплению промежуточных продуктов предшествующих стадий. Недостаток данного метода — трудность подбора специфических ингибиторов для всех (или большинства) стадий биохимического процесса.

Генетическим аналогом метода ингибиторов является метод, основанный на получении мутантов с дефектом гена одного из ферментов. Такие мутации, как правило, являются летальными, однако добавление в среду необходимых конечных продуктов обеспечивает рост мутанта, в клетках которого могут накапливаться промежуточные продукты, предшествующие стадии, катализируемой дефектным ферментом.

Широкое распространение получило использование субстратов с радиоактивной меткой, расположенной в различных частях молекулы. Прослеживание ее судьбы (методами хроматографии и автордиографии) в промежуточных и конечных продуктах позволяет реконструировать последовательность химических реакций в метаболическом пути.

Разновидностью данного метода является использование стабильных изотопов кислорода, азота и серы. Например, при изучении фотосинтеза с помощью «тяжелого» изотопа кислорода ( $^{18}\text{O}$ ) удалось показать, что в процессе фотосинтеза у растений молекулярный кислород получается из воды, а кислород углекислого газа распределяется между вновь образующейся водой и органическими продуктами фотосинтеза:



При использовании тяжелых изотопов иногда возникают осложнения, связанные с тем, что ферменты различают соединения с легкими и тяжелыми изотопами одного и того же элемента, в результате чего скорости их превращений могут различаться. Это обстоятельство необходимо учитывать при трактовке результатов. В то же время такая специфичность ферментов позволяет различать продукты, образовавшиеся при их участии, и продукты, образованные абиогенным путем (в самопроизвольно протекающих химических реакциях), поскольку первые, как правило, оказываются обогащенными легкими аналогами изотопов. Такие исследования позволяют делать очень важные выводы о роли микроорганизмов в геохимических и экологических процессах.

Еще одним вариантом использования изотопов в биохимических исследованиях является применение *ядерного магнитного резонанса* (ЯМР).

Этот метод основан на том, что элементы с нечетными массовыми числами ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  и т.д.) обладают магнитными свойствами, тогда как другие ( $^{16}\text{O}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,) – немагнитны. Если атомы первых элементов поместить в сильное магнитное поле (создаваемое ЯМР-спектрометрами), они способны поглощать квант энергии при резонансной частоте, которая зависит от химического окружения данного атома. В результате удается зарегистрировать ЯМР- спектры, позволяющие сделать важные заключения о структуре молекулы, содержащей данный атом, а следовательно, установить, в частности, природу промежуточных продуктов биохимического пути. Весьма существенно, что ЯМР-спектроскопия не оказывает повреждающего воздействия на химическую структуру веществ и ее можно применять к живым объектам.

### 3.6. АЗОТФИКСАЦИЯ

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

1. Образование окислов азота под воздействием *электрических разрядов в атмосфере (во время грозы) или путем фотохимического окисления аммиака*. Эти процессы трудно поддаются количественному учету, но маловероятно, что они играют существенную роль в современных условиях.

2. Образование аммиака и окислов азота в *химических реакциях в результате техногенных процессов, осуществляемых человеком* и лежащих в основе производства азотных удобрений. По разным оценкам, таким образом достигается связывание  $4-6 \cdot 10^7$  т азота в год.

3. *Фиксация азота клетками прокариот*, которая, как это ни удивительно, значительно превышает результаты, достигнутые человеком в самых совершенных химических производствах — примерно  $2-3 \cdot 10^{11}$  т азота в год (до 300 кг азота на гектар почвы). До развития техногенных способов связывания азота в XX столетии этот процесс был единственным, обеспечивавшим потребность в азоте всех живых организмов на Земле.

Азотфиксация была открыта С.Н. Виноградским в 1883 г. на примере выделенных из почвы бактерий, названных им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*. Способность к азотфиксации обнаружена только у прокариот и широко распространена среди различных физиологических групп: аэробов, микроаэрофилов, анаэробов, фототрофов, как свободноживущих, так и симбиотических (с растениями и грибами). Эти организмы принадлежат к различным таксономическим группам (*Proteobacteria*, *Firmacutes*, *Actinobacteria*, *Chlorobia*, *Cyanobacteria*). Следует отметить, что гены, определяющие способность к фиксации азота (nif-гены), легко передаются путем *горизонтального переноса* от одних прокариот к другим. Среди архей способность к азотфиксации установлена пока только у метаногенов.

Процесс азотфиксации чрезвычайно энергоемок: для восстановления одной молекулы  $N_2$  необходимо затратить 12 молекул АТФ; иначе говоря, для ассимиляции 1 мг азота *Clostridium* перерабатывает 500 мг глюкозы.

Азотфиксация осуществляется с помощью фермента *нитрогеназы*. Известны три типа нитрогеназ. Наиболее распространена нитрогеназа, содержащая молибден в комплексе с гомоцитратом и Fe-S-центрами. Существуют нитрогеназы, в которых молибден замещен ванадием, а также нитрогеназы,

не содержащие других металлов, кроме железа. Интересно, что в клетках одного и того же организма могут присутствовать нитрогеназы двух или всех трех типов (в зависимости от доступности молибдена или ванадия в окружающей среде).

Молекула любой нитрогеназы состоит из двух металлопротеинов. Компонент 1 – тетрамерный белок с молекулярной массой 245 кДа, представляющий собой истинную нитрогеназу, взаимодействующую с молекулярным азотом, получил название *молибдоферредоксина*, или MoFe-белка. Компонент 2 – димерный белок с молекулярной массой 62,4 кДа, представляет собой Fe-S-белок, называемый *азоферредоксином*. Он принимает электроны от восстановленного ферредоксина или флаводоксина (небольшого по размеру флавопротеина) и передает их путем АТФ-зависимой реакции на компонент 1. Способы восстановления ферредоксина, передающих электроны на нитрогеназу, показаны (рис. 3.30).



Рис. 3.30. Реакции восстановления ферредоксина как источника восстановительных эквивалентов для нитрогеназы [7]

Для восстановления молекулы азота необходим перенос шести электронов. Однако за один цикл не может быть перенесено более двух электронов, поэтому процесс включает три последовательно протекающих стадии, при которых образуются

связанные с ферментом промежуточные продукты:  $\text{HN}=\text{NH}$  (диимид) и  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$  (гидразин). Ни одно из этих соединений обнаружить не удастся, так что единственным идентифицируемым продуктом азотфиксации является  $\text{NH}_3$  (рис. 3.31).

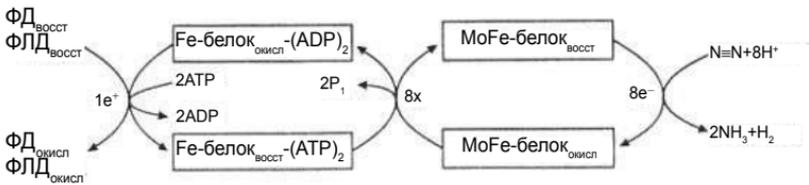


Рис. 3.31. Последовательность событий в нитрогеназной реакции

Все компоненты нитрогеназ очень чувствительны к кислороду, поэтому их синтез и активность подавляются в аэробных условиях, если отсутствуют способы защиты от кислорода. Такая защита функционирует у облигатно- и факультативно-аэробных бактерий и основывается на следующих механизмах.

1. У облигатно-аэробных бактерий, подобных *Azotobacter*, действует механизм *дыхательной защиты*, заключающийся в повышении скорости поглощения кислорода путем включения альтернативной дыхательной цепи, содержащей цитохром *d*. При этом способе защиты скорость дыхания так высока, что весь попавший в клетку кислород восстанавливается дыхательной цепью быстрее, чем попадает в цитоплазму и инактивирует нитрогеназу.

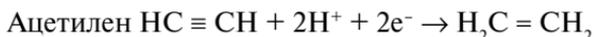
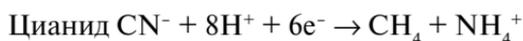
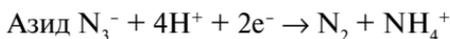
2. Факультативные аэробы (фототрофы) используют механизм *конформационной защиты*, заключающийся в связывании нитрогеназы с защитным белком. Хотя при этом активность нитрогеназы снижается, она становится нечувствительной к кислороду.

3. Некоторые бактерии используют *морфологическую*, или *поведенческую*, *адаптацию*. У цианобактерий азотфиксация протекает в *гетероцистах*, лишенных второй фотосистемы и поэтому не способных к выделению кислорода. У симбиотических азотфиксаторов низкое парциальное давление кислорода в клубеньках, содержащих азотфиксирующие бактерии, поддерживается путем образования особого гемоглобина (*леггемоглобина*). У подвижных бактерий наблюдается *отрицательный азотаксис*, позволяющий клеткам мигрировать в зоны с пониженным содержанием кислорода. Наконец, опреде-

ленную роль в защите от кислорода может играть образование слизистого *гликокаликса* (капсульных полисахаридов), затрудняющего диффузию кислорода.

Основную роль в *регуляции* синтеза нитрогеназы играют ионы аммония: нитрогеназа образуется только при очень низкой внутриклеточной их концентрации. Один из механизмов такой регуляции (у *Klebsiella*) состоит в том, что белок-регулятор (*NifA*) транскрипции генов азотфиксации действует как активатор альтернативного фактора  $\sigma^{54}$ , необходимого для экспрессии генов нестандартных физиологических функций. Когда содержание ионов аммония превышает пороговый уровень (или в присутствии кислорода), с белком *NifA* соединяется белок-ингибитор (*NifL*), блокирующий его функцию.

Нитрогеназа способна восстанавливать и ряд других веществ:



Способность нитрогеназы восстанавливать ацетилен в этилен иногда используется в качестве быстрого метода определения нитрогеназной активности.

## 3.7. ТРАНСПОРТ СУБСТРАТОВ И ПРОДУКТОВ

### 3.7.1. МЕХАНИЗМЫ КЛЕТЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

С клеточной мембраной связан целый ряд важнейших метаболических процессов. Главные из них: репликация ДНК; биосинтез белков, липидов, компонентов клеточной стенки; дыхание, фотосинтез; клеточное деление и, наконец, мембранный транспорт, который и будет предметом рассмотрения в данной главе.

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

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

*Пассивная проницаемость* мембраны – это проникновение через нее веществ за счет теплового движения молекул. Конечным итогом такого процесса является *уравнивание внеклеточной* ( $S_0$ ) и *внутриклеточной* ( $S_{in}$ ) концентраций вещества. Начальная скорость физической диффузии зависит от внешней концентрации вещества (точнее, от градиента концентрации  $\Delta S = S_0 - S_{in}$ ), а изменение температуры (в пределах физиологической нормы) мало влияет на скорость процесса (поскольку он зависит от абсолютной температуры, К).

Для большинства гидрофильных природных субстратов (сахаров, аминокислот, органических кислот в диссоциированном состоянии и др.) коэффициент диффузии через двойной липидный слой мембраны имеет очень низкую величину, поэтому скорость их диффузии недостаточна для обеспечения нормального протекания метаболических процессов.

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

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

Значительно чаще транспорт приводит к заметному *концентрационному* транспортируемых веществ в клетке, так что  $S_{in} \gg S_0$ . Такой транспорт представляет собой термодинамическую работу и требует затраты энергии. Его называют *концентрирующей*

щим или (менее правильно) *активным* транспортом (в действительности любой транспорт *активен*).

Особенностью транспортных процессов, в отличие от диффузии, является также их *стереоспецифичность*, в результате которой близкие по химической структуре вещества конкурируют при транспорте за общий переносчик (канал). Ограниченное количество молекул переносчика в мембране приводит к тому, что зависимость *начальной скорости* транспорта от *концентрации субстрата* описывается уравнением гиперболы, формально сходным с уравнением Михаэлиса–Ментен, описывающим ферментативную кинетику с аналогичными параметрами ( $K_m$  и  $V_{\max}$ ) (см. разд. 2.2):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/S_0},$$

где  $V$  – начальная скорость транспорта;  $V_{\max}$  – максимальная скорость при насыщающей концентрации субстрата ( $S_0$ );  $K_m$  – концентрация субстрата, при которой скорость транспорта равна половине максимальной. В этом случае говорят, что транспортный процесс подчиняется «кинетики насыщения». Величины  $K_m$  и  $V_{\max}$  называют *параметрами транспортной системы*:  $K_m$  характеризует *средство* транспортного посредника к субстрату, а  $V_{\max}$  – пропорциональна *количеству* посредника в мембране и *скорости* его функционирования. Для вычисления этих параметров, как и в ферментативной кинетике, используют графики линейных аппроксимат уравнения Михаэлиса–Ментен (метод Лайнуивера–Берка и др. с теми же ограничениями, см. разд. 2.2).

### 3.7.2. ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ

Одной из первых моделей транслокации субстратов через биологические мембраны была модель «подвижного» переносчика, в которой предполагалось присутствие интегрального мембранного компонента, способного к образованию гидрофобного комплекса с гидрофильным субстратом, экранирующего последний от гидрофобной внутримембранной среды. Предполагалось, что образованный комплекс диффундирует на внутреннюю поверхность мембраны и там освобождает суб-

страт во внутриклеточную среду. По этому типу действительно осуществляется перенос ионов некоторыми ионофорами (валиномицином, моненсином и др.) (рис. 3.32, а). Однако подобный механизм, как правило, не обеспечивает концентрирование субстрата в клетке.

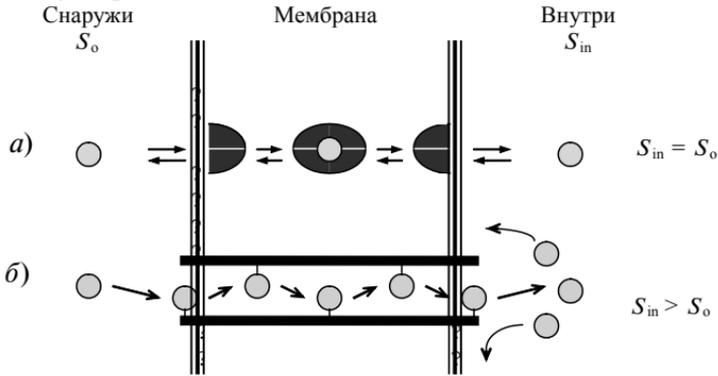


Рис.3.32. Схема двух основных способов транслокации субстратов: а — модель «подвижного» переносчика; б — модель трансмембранного «канала»

Другая модель предполагает наличие в мембране *гидрофильного канала*, через который могут проникать субстраты. В отличие от малоспецифичных каналов, образуемых поринами, данный канал должен обладать высокой специфичностью за счет «эстафетной» передачи субстрата от одного центра связывания к другому. Такой канал может стать асимметричным (например, при наложении ТЭП) и обеспечить концентрирование субстрата в клетке (рис. 3.22, б).

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

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

1. Транспортные системы, включающие *периплазматические связывающие белки*, которые обеспечивают «узнавание» и «доставку» субстрата к мембранному переносчику. Такие системы чувствительны к осмотическому шоку и зависят от энергии

АТФ. К ним относятся системы транспорта некоторых аминокислот (глутамина), сахаров (арабинозы), неорганических катионов ( $K^+$ ).

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

### 3.7.3. СПОСОБЫ СОПРЯЖЕНИЯ ТРАНСПОРТА С ЭНЕРГИЕЙ МЕТАБОЛИЗМА

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

Сопряжение транслокации субстрата с энергией метаболизма осуществляется двумя основными путями.

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

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

Системы первого типа фактически осуществляют первый (или один из первых) этапов метаболизма этих субстратов и поэтому называются системами *векторного метаболизма* или *реакциями переноса радикалов*. К ним, например, относится фосфотрансферазная система транспорта сахаров и сахароспиртов (источник энергии – PEP), называемая также системой векторного фосфорилирования, и некоторые другие системы.

Фосфотрансферазная система опосредует следующую цепь реакций, приведенную на рис. 3.33.

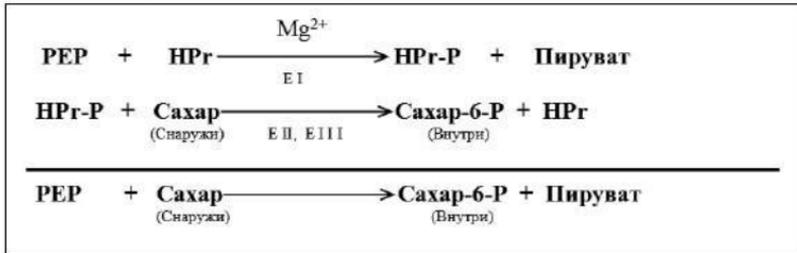


Рис. 3.33. Последовательность реакций «векторного фосфорилирования» в фосфотрансферазной системе:

PEP – фосфоенолпируват; EI – фермент 1 (кодируется геном *pts1*); HPr – низкомолекулярный полипептид (кодируется геном *ptsH*) оперона *pts Escherichia coli*; EII – фермент 2, являющийся сахароспецифичным «узнающим» компонентом, интегральным мембранным белком, осуществляющим транслокацию сахара через мембрану, сопровождающуюся фосфорилированием с помощью периферического белка EIII, также специфичного к сахарам

Системы второго типа, в свою очередь, подразделяются на системы первичного активного транспорта, *генерирующие ТЭП* (дыхательная и фотосинтетическая цепи, декарбоксилазы,  $H^+$ -АТФазы и др.) и системы «вторичного» активного транспорта, *использующие ТЭП* для транспорта органических и неорганических субстратов. В некоторых случаях, например, в системах со связывающими белками, энергия АТФ непосредственно используется в транспорте субстратов.

Системы вторичного активного транспорта распространены более широко и могут функционировать в соответствии с тремя основными механизмами (рис. 3.34):

1) *катионы* транслоцируются в клетку по градиенту электрического потенциала путем своеобразного электрофореза (так называемый *унипорт*, по Митчеллу);

2) *незаряженные соединения* транслоцируются в клетку совместно с катионами  $H^+$  или  $Na^+$  (*симпорт*);

3) *анионы* также могут транслоцироваться в клетку путем симпорта, присоединяя такое количество катионов, которого достаточно для перевода комплекса субстрата с переносчиком в положительно заряженную форму. Кроме того, анионы внешней среды могут обмениваться на внутриклеточные анионы

(антипорт). По механизму антипорта могут транслоцироваться и катионы, например у прокариот широко распространена система антипорта  $H^+$  и  $Na^+$ , а у эукариот – система антипорта  $K^+$  и  $Na^+$  ( $K^+$ ,  $Na^+$ -АТФазы).

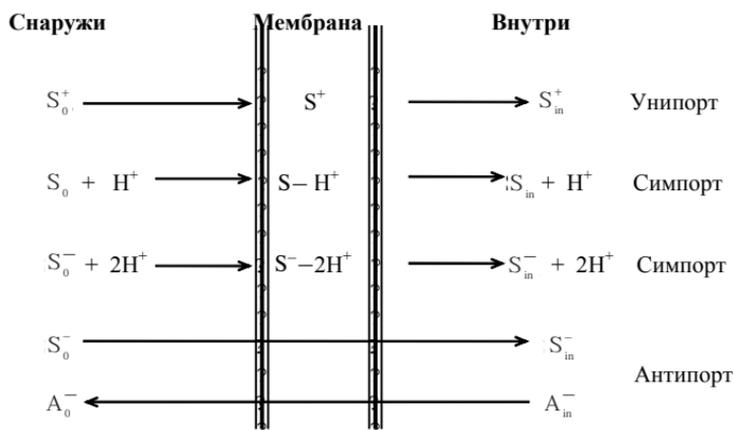


Рис. 3.34. Три основных типа сопряженного транспорта через биологические мембраны

### 3.7.4. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ

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

Основными механизмами регуляции биосинтеза переносчиков транспортных систем являются *индукция*, *репрессия* и *катаболитная репрессия* (см. разд. 4.1).

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

Особенность регуляции некоторых транспортных процессов состоит в том, что индукция осуществляется не внутриклеточным субстратом (как в классических случаях, в которых

индуктор инактивирует внутриклеточный репрессор), а *внеклеточным субстратом*. Такая индукция называется *экзогенной* и требует наличия промежуточного регуляторного интегрального мембранного белка, передающего сигнал индуктора на репрессор (рис. 3.35).

### Внутри

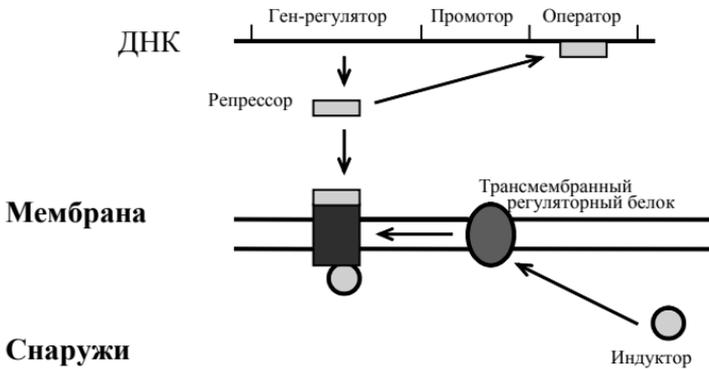


Рис. 3.35. Схема «экзогенной» индукции (ср. с рис. 3.30)

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

Подобный тип индукции характерен, например, для транспортной системы гексозофосфатов, фосфоглицерата, некоторых трикарбоновых кислот, а также компонентов фосфотрансферазной системы.

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

Регуляция *активности* белковых посредников транспортных систем может производиться путем *обратимой ковалентной модификации* (например, путем *фосфорилирования* регулируется активность фосфотрансферазной системы, а также  $K^+, Na^+$ -АТФазы) или *нековалентного взаимодействия с эффекторами*.

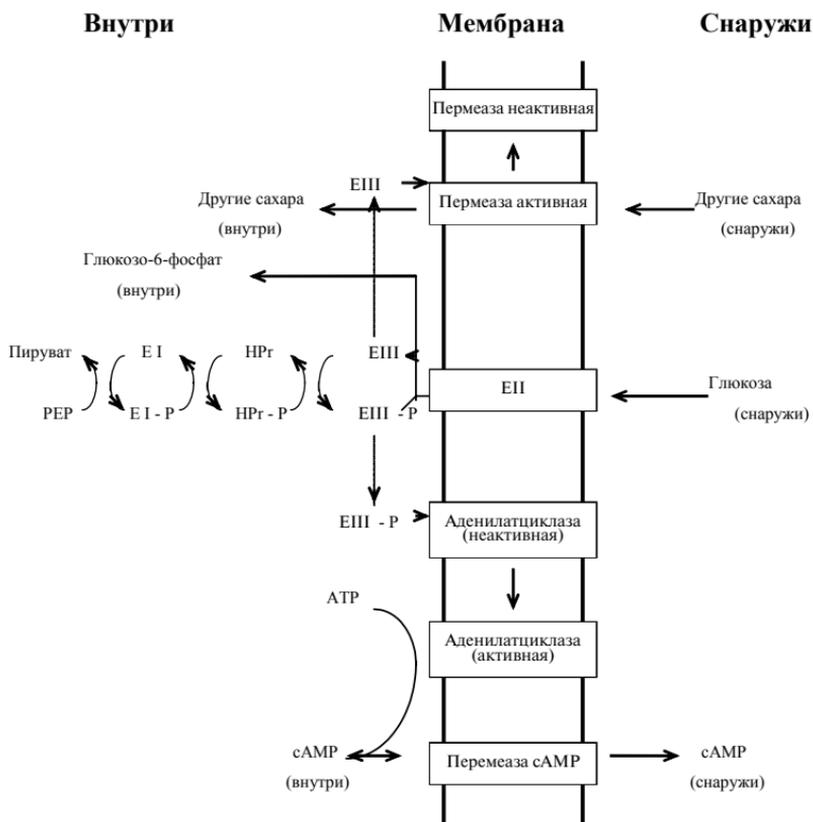
В последнем случае, если эффектор взаимодействует с транспортной системой, находясь на той же стороне мембраны, где находится субстрат, говорят о *цис-регуляции* транспорта. Например, отрицательная цис-кооперативность обнаруживается при транспорте пролина у *E. coli*: избыток субстрата тормозит свой собственный транспорт из среды. У галобактерий наряду с обычными четырьмя транспортными системами для ароматических аминокислот существует еще высокоспецифичная транспортная система для тирозина, обладающая очень высоким сродством к субстрату, активность которой подавляется избытком тирозина по безконкурентному типу.

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

События, связанные с регуляцией транспортных процессов, иногда оказывают существенное влияние на регуляцию метаболизма в целом. Яркий пример — участие фосфотрансферазной системы в регуляции биосинтеза белков по типу катаболитной репрессии. Оказалось, что уровень сАМР у *E. coli* облигатно зависит от функционирования фосфотрансферазной системы, причем главную роль в этой связи играет специфический для глюкозы компонент ЕПН (рис. 3.36).

Отсутствие глюкозы все компоненты системы, в том числе и ЕПН, находятся в *фосфорилированном* состоянии за счет резерва РЕР. Фосфорилированный ЕПН, взаимодействуя с *аденилатциклазой*, переводит ее в активное состояние, в результате чего внутриклеточный уровень сАМР повышается и активируется транскрипция «слабых» оперонов, в том числе систем транспорта и метаболизма других сахаров (т.е. снимается катаболитная репрессия). Напротив, в присутствии глюкозы степень фосфорилирования ЕПН снижается в связи с переносом

фосфорильного остатка на глюкозу в процессе ее транспорта. В результате уменьшается активность аденилатциклазы, снижается уровень сАМР и блокируется транскрипция ряда «сахарных» оперонов (т.е. наступает катаболитная репрессия).



*Рис. 3.36.* Роль фосфотрансферной системы в катаболитной репрессии: EI, HPr, EII, EII-P – белковые компоненты системы, которые могут акцептировать фосфорильный остаток (P); EI и HPr – «растворимые» неспецифичные компоненты, EII и EII-P – сахароспецифичны, причем EII выполняет роль транспортного «переносчика». В процессе транспорта сахар (глюкоза) фосфорилируется и накапливается внутри клетки. Фосфорилированная форма EII-P, образующаяся за счет фосфоенолпирувата (PEP) в отсутствие глюкозы, активирует аденилатциклазу, свободная форма EII, накапливающаяся в присутствии глюкозы, подавляет активность транспортных систем других сахаров

К этому следует добавить, что нефосфорилированная форма ЕП, по-видимому, может инактивировать транспортные системы других сахаров, предотвращая поступление последних в клетку. Это еще более усиливает катаболитную репрессию.

Возникает естественный вопрос: каков механизм катаболитной репрессии в том случае, когда подавляется синтез ферментов, ответственных за катаболизм самой глюкозы, а в качестве более выгодных в энергетическом смысле субстратов выступают, например, органические кислоты или водород. Следует ли иметь в виду, что участие фосфотрансферазной системы в этом случае невозможно? Чтобы понять механизм явления, необходимо обратить внимание на нижнюю часть рис. 3.36, где изображена система экскреции сАМР.

Значение систем экскреции для регуляции метаболизма мы рассмотрим подробнее в следующем разделе, а сейчас только отметим, что одним из способов снижения уровня сАМР может служить активирование его выброса из клетки, например, с помощью наложения на мембрану ТЭП, т.е. путем «энергизации» мембраны, степень которой, естественно, будет выше всегда, когда используется более выгодный в энергетическом отношении субстрат. Таким образом, если субстрат обеспечивает энергетические потребности клетки и создает необходимую степень «энергизации» мембраны, он может (потенциально) вызывать подавление влияния других субстратов, использование которых зависит от уровня сАМР в клетке (что и приведет к эффекту, сходному с катаболитной репрессией).

### 3.7.5. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ИЗ КЛЕТКИ В СРЕДУ: СЕКРЕЦИЯ И ЭКСКРЕЦИЯ

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

Обратимся прежде всего к процессам *секреции*, т.е. выделению из клетки белков (ферментов).

Секретируемые белки (*экзоферменты*) синтезируются в виде более длинных предшественников, которые подвергаются процессингу, как правило, на этапе транслокации через мем-

брану. Они содержат на  $\text{NH}_2$ -конце так называемый *сигнальный пептид* из 15–30 аминокислот (преимущественно гидрофобных), которые удаляются специальной *сигнальной пептидазой*, локализованной в мембране.

Транслокация белка через мембрану обычно протекает одновременно с трансляцией (*котрансляционная транслокация*), хотя известны случаи *посттрансляционной транслокации* (рис. 3.37).

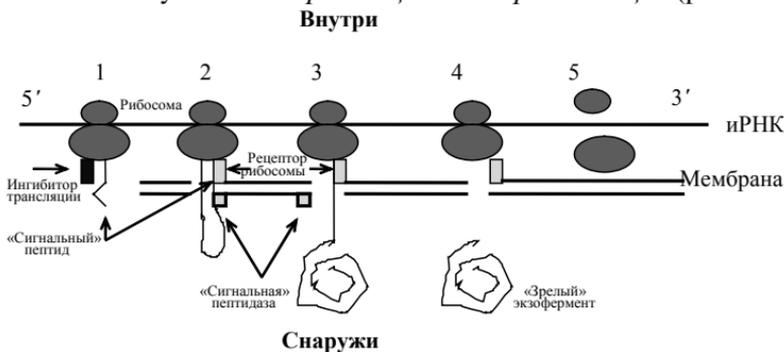


Рис. 3.37. Схема котрансляционной секреции экзофермента

После образования сигнального пептида трансляция временно прекращается в результате присоединения к рибосоме нуклеопротеидного ингибитора (1) так называемого *signal recognition particle (SRP)* (еще один способ регуляции трансляции на стадии элонгации!) и полисомный комплекс перемещается к мембране, где локализован *аппарат секреции*, включающий *рецепторы* рибосомы и сигнального пептида. Происходит формирование трансмембранной «поры» (2). Сигнальный пептид закрепляется на своем рецепторе, и трансляция возобновляется, причем растущая пептидная цепь «проталкивается» через мембрану (3). Сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой, и «зрелая» молекула фермента отделяется от рибосомы (4). После завершения трансляции рибосомный комплекс покидает мембрану и диссоциирует на субчастицы для подготовки нового цикла трансляции (5).

Сходный механизм используется при образовании белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Эти белки содержат гидрофобную «якорную» последовательность, которая позволяет такому белку закрепиться в мембране. Процесс секреции данных белков часто называют *экспортом*. У грамотрицательных бактерий обнаружено до семи разных систем секреции.

У эукариот решающее значение в процессе секреции ферментов имеют эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи (см. разд 1.2).

Для описания процесса выделения из клеток *низкомолекулярных веществ* используют термин *экскреция*. Экскреция может выполнять три основные физиологические функции, а именно удаление:

а) ингибитора, который токсичен для клетки, вещества, продуцируемого эндогенно или поступающего из окружающей среды (например, антибиотика). Этот механизм лежит в основе множественной лекарственной устойчивости бактерий (multidrug resistance, MDR);

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

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

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

Хорошо изученными примерами экскреции *первого типа* являются транспортные системы, кодируемые плазидами и опосредующие энергозависимое удаление антибиотиков-тетрациклинов, а также анионов арсената и катионов  $Cd^{2+}$  из клеток устойчивых к этим ингибиторам микроорганизмов. Примерами экскреции *второго типа* является так называемый «выброс» индуктора в системе метаболизма лактозы (кодируемой *lac*-опероном) под действием глюкозы, а также экскреция cAMP в результате повышения ТЭП. Оба эти эффекта представляют собой дополнительные проявления регуляции метаболизма по механизму катаболитной репрессии. Наконец, примером экскреции *третьего типа* является выделение лактата в процессе молочнокислого брожения, в результате чего происходит «сброс» восстановительных эквивалентов и формирование ТЭП (см. разд. 3.1).

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

## Глава 4

# РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА

### 4.1. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ НА ЭТАПЕ ТРАНСКРИПЦИИ

#### 4.1.1. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

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

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

Необходимо отметить, что термин «хромосома» как место локализации ДНК применим только к клеткам эукариот, тогда как часто используемый термин «бактериальная хромосома» неточен, и лучше говорить о генофоре или нуклеоиде, подразумевая под этим ДНК-РНК-белковый комплекс, ответственный за хранение и использование основной части генетической информации клетки прокариот.

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

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

- Она осуществляется по полуконсервативному механизму (т. е. одна из цепей служит матрицей для сборки другой), причем цепи ДНК «антипараллельны», т.е. направлены в противоположные стороны одна относительно другой – одна цепь имеет направление 3'-Р→5'-ОН, а другая – противоположное. 3'-конец содержит остаток ортофосфата – Р, а 5'-конец – ОН:



Последующей транскрипции подвергается только одна цепь.

- Синтез протекает полунепрерывно, т.е. одна цепь синтезируется непрерывно в направлении 5' → 3', а вторая – прерывисто (с образованием фрагментов Оказаки, также в направлении 5' → 3', соединяемых затем в одну молекулу ферментами лигазами).

- Каждая цепь начинается с РНК-затравки (о-РНК, синтезируемой ферментом праймазой) с последующим ее выщеплением.

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

- Существуют четыре основных типа систем репликации: синтез фрагментов, репликация плазмид (у прокариот), рекомбинационный синтез ДНК, репарационный синтез ДНК. В каждом из них участвуют как общие, так и специфические компоненты. Кроме этого, существуют специфические системы репарации, включающиеся в стрессовых условиях и приводящие к появлению мутаций (ДНК-полимераза IV).

- Нативная система репликации ДНК является мембранной и инактивируется при разрушении мембран. Поэтому для моделирования процесса репликации используются, как пра-

вило, упрощенные системы, полученные из бактериальных «условных» мутантов (например, температурочувствительных) или из «маленьких» (tiny) фагов (φX174, G4, M13 и др.).

- Репликация всегда начинается с одного специального участка — точки начала репликации (oriC). Каждый независимо реплицирующийся фрагмент ДНК содержит одну точку oriC и называется репликоном. Репликонами у прокариот являются нуклеоид, плазмиды, фаги. В точке oriC содержится несколько повторяющихся последовательностей нуклеотидов, называемых итеронами и являющихся сайтами связывания для полисубъединичного инициаторного белка. После связывания с итеронами инициаторный белок способствует раскручиванию близкорасположенного АТ-богатого участка для связывания с ним РНК-затравки.

- Регуляция процесса репликации ДНК наиболее строго осуществляется на этапе инициации. Репликация находится под положительным и отрицательным контролем, причем оба они скоординированы с клеточным делением. В общих чертах принцип такой регуляции можно сформулировать следующим образом. При положительном контроле происходит накопление активатора репликации до порогового уровня, достаточного для инициации нового цикла репликации. Пороговый уровень достигается при удвоении клеточной массы — незадолго до деления клетки с тем, чтобы во вновь образовавшихся клетках процесс репликации был бы уже запущен и успел завершиться к моменту нового деления. При отрицательном контроле происходит накопление ингибитора инициации репликации, который должен синтезироваться лишь в ограниченном количестве вскоре после начала предыдущего цикла репликации. Такой ингибитор может быть продуктом гена, локализованного вблизи от точки начала репликации, транскрипция которого осуществляется только в период репликации данного участка ДНК. В процессе роста клетки ингибитор «разбавляется», а к моменту удвоения массы клетки уровень его падает ниже критического, что позволяет клетке иницировать новый цикл репликации. Взаимодействие этих двух механизмов и должно координировать процессы репликации ДНК и деления клетки.

У эукариот определенную роль в регуляции репликации играют гистоны, а у прокариот — гистоноподобные белки.

### 4.1.2. ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Этот этап биосинтеза белков состоит в «переписывании» — транскрипции информации (от англ. *transcription* — переписывание), закодированной в ДНК, на олигонуклеотидную последовательность информационной РНК (иРНК) и осуществляется РНК-полимеразой (РНКП). Строение этого фермента лучше всего изучено у бактерий *E. coli*. Это сложный белок с молекулярной массой 450 кДа. Его сердцевина (core) включает две идентичные  $\alpha$ -субъединицы и две различные  $\beta$ -субъединицы ( $\beta$  и  $\beta'$ ). В состав полного фермента (holoenzyme) входит также  $\sigma$ -субъединица ( $\sigma$ -фактор), ответственная за процесс узнавания промотора и инициацию транскрипции. Клетки бактерий содержат несколько различных  $\sigma$ -факторов, каждый из которых узнает специфический промотор. Наконец, существует еще один белковый компонент, обозначаемый  $\rho$ -фактор, который ответственен за правильную терминацию транскрипции. Таким образом, РНКП *Escherichia coli* и ряда других грамотрицательных бактерий выглядит следующим образом (рис 14.1):

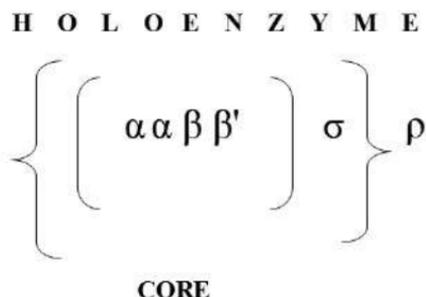


Рис. 4.1. Строение РНК-полимеразы *E. coli*:  
 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\sigma$ ,  $\rho$  — белковые субъединицы

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

В клетках эукариот обнаружено, по крайней мере, три типа РНКП. Полимераза I (или А) находится в ядрышке и транскрибирует гены большинства рибосомных РНК (рРНК); поли-

мераза II (или В) — в нуклеоплазме и транскрибирует большую часть других генов; полимеразы III (или С) — гены транспортных РНК (тРНК) и одной из рРНК (5S рРНК). Кроме того, в митохондриях и хлоропластах эукариот присутствуют собственные РНКП.

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

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

### 4.1.3. РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССА ТРАНСКРИПЦИИ

Исходя из возможности управления синтезом на этапе транскрипции, белковые посредники можно разделить на три основные группы:

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

**Регуляция на этапе инициации транскрипции.** В 1960-е годы Ф. Жакоб и Ж. Моно установили, что в явлениях индукции и репрессии принимают участие белковые факторы — репрессоры, продукты специальных генетических элементов — генов-регуляторов (I-генов), способные в определенных условиях тормозить процесс транскрипции на этапе инициации. Поэтому оба этих типа регуляции относят к *негативным*. Подчеркнем, что индуцибельные белки (количество которых возрастает в процессе индукции) также регулируются по негативному механизму. В этом нет противоречия, потому что один из резуль-

татов (повышение транскрипции) относится к феноменологии процесса, а второй (регуляция транскрипции) — к его механизму, состоящему в переводе репрессора (отрицательного регулятора) в неактивное (индукция) или активное (репрессия) состояние (см. далее).

Репрессоры могут быть представлены не только белками, но и так называемой «антисмысловой РНК», функцией которой является связывание с определенным, комплементарным ей участком ДНК гена-оператора для блокирования транскрипции структурных генов, расположенных за геном-оператором.

В индуцируемом опероне ген-регулятор кодирует активный репрессор (около 10 молекул на клетку), который блокирует транскрипцию, взаимодействуя с операторным участком ДНК и препятствуя продвижению РНКП. Индуктор, представляющий собой исходный субстрат данного метаболического пути или близкое к нему соединение (например, аллолактоза в случае *lac*-оперона), способен взаимодействовать с репрессором и инактивировать его, освобождая таким образом операторный участок ДНК. В результате РНКП начинает транскрипцию данного оперона. Эти события отражены в схеме на рис. 4.2, *a*.

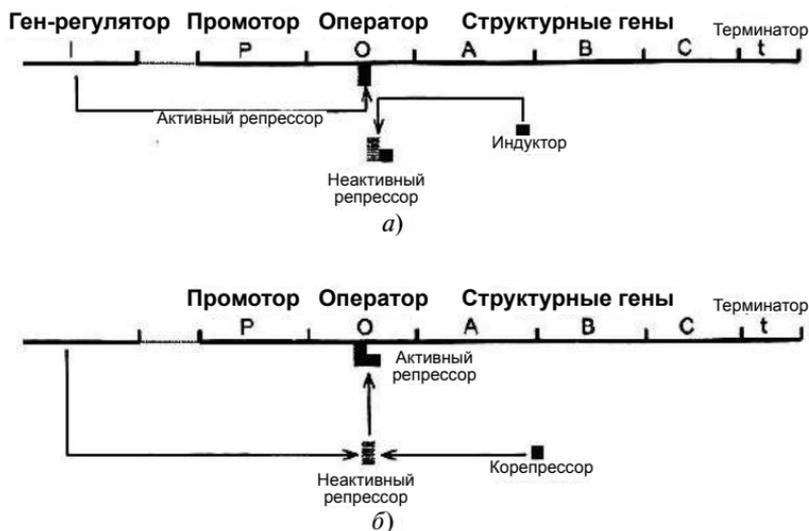


Рис. 4.2. Схемы: *a* — индуцируемого оперона и процесса индукции; *б* — репрессуемого оперона и процесса репрессии

В репрессируемом опероне ген-регулятор кодирует неактивный репрессор, который может переходить в активное состояние и блокировать транскрипцию, соединяясь с оператором, только после взаимодействия с избытком конечного продукта (корепрессора) данного метаболического пути (в случае биосинтетических путей таким корепрессором может быть, например, аминокислота). Процесс отражен в схеме, представленной на рис. 4.2, б.

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

Механизм явления катаболитной репрессии состоит в следующем. Для индукции некоторых «слабых» оперонов, в том числе *lac*-оперона, недостаточно инактивации отрицательного регулятора – репрессора. Необходимо также участие положительного регулятора, представляющего собой комплекс специального активирующего белка с циклическим аденозинмонофосфатом (сАМФ) (рис. 4.3).

Белок, активирующий транскрипцию, получил название БАК-белка или «белка, активирующего катаболитные гены» (англ. эквивалент – CAP-protein, «catabolite gene activating protein»). БАК-белок представляет собой димер с молекулярной массой 45 кДа. Под действием сАМФ он подвергается конформационным изменениям и приобретает повышенную способность связываться с промотором. Присоединение комплекса

cAMP-БАК к ДНК ослабляет спаривание ГЦ-оснований, способствует частичному разделению спиралей ДНК и облегчает формирование иницирующего транскрипцию комплекса РНКП с ДНК. Уровень cAMP в клетке обратно пропорционален уровню АТР; в присутствии легко метаболизируемых субстратов (глюкозы), способствующих повышению уровня АТР, cAMP «не хватает» для образования комплекса с БАК. То есть, когда в клетке много АТР и мало AMP и нет необходимости в интенсификации катаболических процессов, уровень ферментов катаболизма может быть снижен, что и происходит посредством инактивации БАК регулятора.

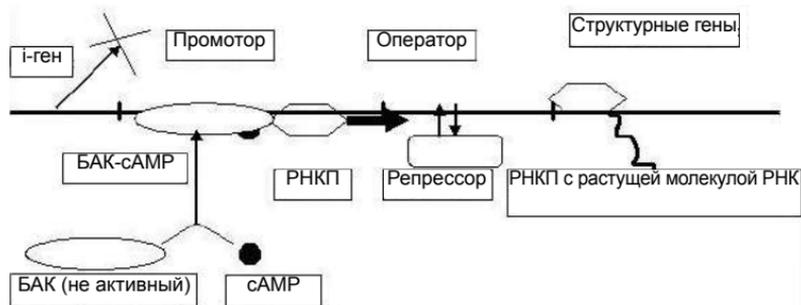


Рис. 4.3. Схема функционирования оперона, находящегося под положительным контролем БАК-белка

Тонкие механизмы регуляции уровня cAMP связаны с функционированием фосфотрансферазной системы транспорта сахаров и рассмотрены в разд. 3.7, посвященном регуляции процессов мембранного транспорта.

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

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

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

Еще одним примером положительной регуляции процесса транскрипции является регуляция с участием *генов-«энхансеров»* (от англ. *enhance* – усиливать). Ранее считали, что этот тип регуляции характерен только для эукариот, Но в последнее время формально сходные механизмы обнаружены и у прокариот (табл. 4.1).

Таблица 4.1

**Примеры регуляции транскрипции у бактерий  
с помощью продуктов генов-«энхансеров»**

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

При этом не следует смешивать понятия «генов-энхансеров», существующих у прокариот, с «энхансерами генов», характерных для эукариот, т.е. с определенными последовательностями нуклеотидов, которые содержат сайты связывания нескольких факторов транскрипции. Энхансер гена способен осуществлять регуляторное действие на промотор, находясь на больших расстояниях от него (более 60 тыс. пар оснований), независимо от ориентации по отношению к промоторам и расположения относительно регулируемого гена.

Продуктами генов-«энхансеров» являются белки с молекулярной массой 25–30 кДа, которые могут связываться с промоторной областью. Как правило, такая система двухкомпонентна и включает «сигнальный» белок (его называют также сенсорным), способным «чувствовать» изменение условий окружающей среды (появление субстратов или продуктов, изменение физико-химических условий) и стимулировать синтез другого белка – «активатора», который и запускает транскрипцию искомого белкового посредника. Сказанное поясняет рис. 4.4, где изображена схема регуляции оперона щелочной фосфатазы *E. coli*.

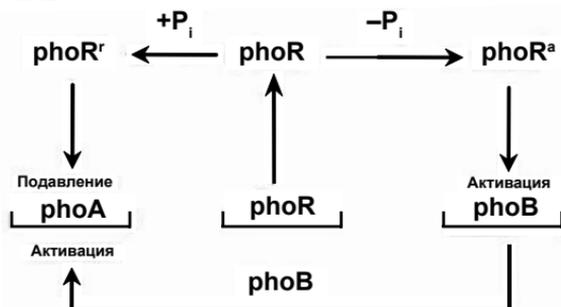


Рис. 4.4. Схема регуляции транскрипции структурного гена щелочной фосфатазы (*phoA*) *E. coli*:

*phoR* – сенсорный ген; *phoB* – ген-«энхансер»; *PhoR* и *PhoB* – белковые продукты соответствующих генов;  $P_i$  – неорганический ортофосфат

Белок *PhoR* в присутствии неорганического ортофосфата переходит в форму репрессора, подавляющего транскрипцию гена *phoA*; а в отсутствие – в форму, стимулирующую транскрипцию гена «энхансера», продукт которого, *PhoB*, активирует транскрипцию *phoA*.

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

Однако наряду с ними существуют механизмы *системной регуляции*, связанные с изменением функционирования одновременно большого числа оперонов. В клетках эукариот это достигается посредством конформационных перестроек хроматина (активный хроматин заметно менее компактен, чем неактивный), процессинга иРНК, а также управления трансляцией путем формирования так называемых информосом (т.е. иРНК, трансляция которых «отложена» до необходимого момента путем аденилирования и формирования нуклеопротеинового комплекса).

В клетках прокариот системная регуляция осуществляется за счет модификации специфичности работы РНКП посредством изменения ее компонентного состава (а также изменения конформации или структуры матрицы – ДНК, о чем см. ниже). Эти механизмы вступают в действие, когда нужно активировать одновременно большое число новых промоторов (стрессовые воздействия, клеточная дифференцировка) или сменить матрицу (размножение фагов). Последний случай изучен наиболее подробно на примере фагов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. В геноме бактериофагов присутствуют три типа генов: ранние, средние и поздние, классифицируемые на основании порядка их транскрипции в ходе развития фага. Ранние гены всегда транскрибируются РНКП клетки-хозяина, а в случае транскрипции средних и поздних генов возможно несколько вариантов:

- среди продуктов ранних генов присутствует собственная фаговая РНКП, а также белки-ингибиторы РНКП хозяина. Таким образом, происходит смена РНКП (нечетные фаги T3, T7 *Escherichia coli*);

- среди продуктов ранних генов присутствуют новые  $\sigma$ -факторы, взаимодействующие с «сердцевидной» РНКП хозяина и обеспечивающие транскрипцию средних генов. Среди продуктов средних генов, в свою очередь, присутствуют белки с функциями  $\sigma$ -факторов, которые обеспечивают транскрипцию поздних генов. Таким образом, происходит смена  $\sigma$ -факторов (фаг sPO1 *Bacillus subtilis*);

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

Регуляция транскрипции путем образования специфических  $\sigma$ -факторов широко распространена и в бактериальных системах. Ввиду ее важности приведем несколько примеров.

Особый  $\sigma$ -фактор ( $\sigma^{60}$ , число в показателе обычно обозначает молекулярную массу, кДа) контролирует транскрипцию ряда генов азотного метаболизма, в том числе гена глутаминсинтетазы, о регуляции активности которой будет идти речь дальше. Существуют промоторы, активирующиеся только при 50°C, в их транскрипции участвует фактор  $\sigma^E$ .

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

При переходе культуры бактерий в стационарную фазу роста, а также при остановке роста из-за неблагоприятных условий происходит активация регулона стационарной фазы, контролируемого фактором  $\sigma^S$  (RpoS).

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

Изменение специфичности «узнавания» РНКП локусов транскрипции может достигаться также взаимодействием регуляторных белков не с ДНК, а с самой РНКП. Кроме того, специфичность РНКП может изменяться под действием низкомолекулярных факторов типа гуанозинполифосфатов (в частности, гуанозинтетрафосфата, ppGpp), называемых еще клеточными *алармонами* — веществами, сигнализаторами опасности. Этот механизм обеспечивает координацию процессов транскрипции и трансляции.

Возможна регуляция и на этапе терминации транскрипции. РНКП может «узнавать» специфические последовательности ДНК, сигнализирующие об окончании транскрипции. Эта ее способность усиливается или модифицируется под влиянием особого полипептида  $\rho$ -фактора, обеспечивающего нормальную терминацию.

Наряду с этим в составе ряда регулонов обнаружены так называемые аттенуаторы (от англ. *attenuation* — ослабление), т.е. участки ДНК, вызывающие преждевременную терминацию, также  $\rho$ -зависимую. Эти генетические элементы располагаются между оператором и первым структурным геном в регулонах, контролирующих биосинтез ряда аминокислот (фенилаланина, триптофана, гистидина, изолейцина, валина) (рис 4.5).

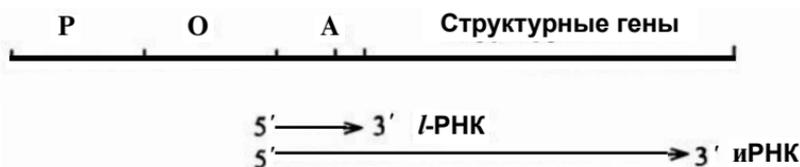


Рис. 4.5. Схема регуляции транскрипции путем аттенуации:

Р — промотор; О — оператор; А — аттенуатор; l-РНК — укороченный транскрипт; иРНК — нормальный транскрипт

Все аминокислотные регулоны, управляемые с помощью аттенуации, характеризуются обогащением участка иРНК, соответствующего расстоянию до аттенуатора, (т.е. «лидерной», или l-РНК) кодонами той аминокислоты, которая служит отрицательным эффектором (например, в триптофановой l-РНК два кодона триптофана подряд, в гистидиновой l-РНК — семь кодонов гистидина и т.д.).

Регуляция путем аттенюации основана на тесном сопряжении у прокариот транскрипции и трансляции, которые, как правило, протекают одновременно (рис. 4.5). В процессе трансляции синтезируемой иРНК рибосома, экранирующая около 10 нуклеотидов, может существенно влиять на конформацию транслируемой иРНК, а та, в свою очередь, на продвижение РНКП по матрице ДНК. При формировании «критической» конформации иРНК («терминирующей петли») наступает диссоциация РНКП от ДНК (преждевременная терминация), зависящая от  $\rho$ -фактора.

На «лидерном» участке иРНК возможно образование трех типов петель: 1–2, 2–3, и 3–4 (рис. 4.6).

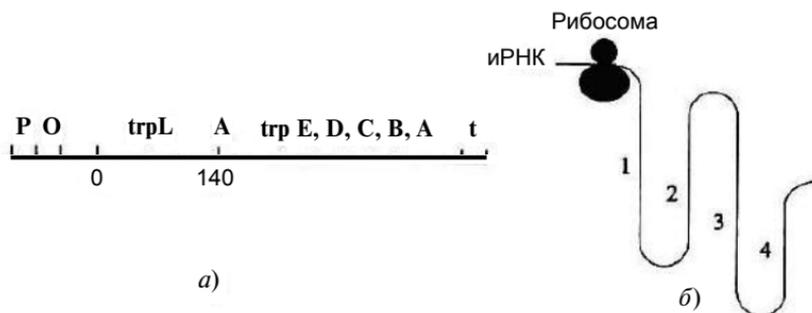


Рис. 4.6. Схема триптофанового оперона и структура транскрипта его «лидерного» участка у *Escherichia coli* (по Mandelstam et al., 1982): а — начальный отрезок *trp*-оперона; б — транскрипт «лидерного» участка (от 50 до 140 нуклеотида); *trp E, D, C, B, A* — структурные гены; *trpL* — «лидерный» участок; цифрами указаны места потенциального формирования внутримолекулярных водородных связей

Полагают, что только образование структуры 3–4 служит для РНКП сигналом терминации и обрывает транскрипцию. В процессе трансляции растущей цепи «лидерного» участка иРНК рибосома перекрывает около 10 нуклеотидов и, таким образом, определяет, какая именно из вторичных структур иРНК реализуется в момент прохождения аттенюатора. При отсутствии в среде триптофана рибосома «застревает» на участке 1, где расположены два триптофановых кодона, способствуя формированию петли 2–3. В результате терминация предотвращается. При наличии избытка триптофана рибосома проходит до участка 2, где локализован терминирующий

кодон «лидерного» пептида, при этом петля 2–3 образоваться уже не может и формируется петля 3–4, определяющая терминацию.

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

Таким образом, если данный регулон управляется путем аттенюации, то в процессе считывания информации с ДНК образуются два типа транскриптов: нормальный, включающий структурные гены, и укороченный, состоящий только из *l*-РНК (см. рис. 4.5).

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

Гистидиновый оперон регулируется только посредством аттенюации. Аналогичная регуляция характерна для синтеза некоторых аминоксил-тРНК-синтаз (АРСаз) и, возможно, ряда экзоферментов. Аттенуатор присутствует также в геноме фага  $\lambda$ . В этом случае эффект аттенуатора может быть нейтрализован специальным регуляторным белком-антитерминатором. Получены данные о том, что комплекс белка БАК с сАМР также может выполнять функцию антитерминатора, например в *gal*-опероне, и, таким образом, не только стимулировать инициацию транскрипции, но и предотвращать преждевременную терминацию.

**Регуляция транскрипции путем изменения количества активной РНК-полимеразы.** РНКП может служить отрицательным регулятором своего собственного биосинтеза,

и при относительном избытке в клетке ее дальнейшее образование тормозится. Координированно регулируется образование  $\beta$ -субъединиц, тогда как образование  $\alpha$ -субъединиц и  $\sigma$ -фактора регулируется независимо. Поэтому в клетке может существовать избыток тех или иных субъединиц РНКП.

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

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

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

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

Косвенным указанием на возможность изменения специфичности транскрипции при изменении степени сверхспирализации ДНК служит тот факт, что в присутствии ингибиторов ДНК-гиразы (антибиотиков налидиксовой кислоты, новобицина, коумермицина) изменяется спектр синтезируемых белков, хотя сами по себе эти ингибиторы не влияют на процессы транскрипции или трансляции. Например, у *Escherichia coli* снижается синтез около 20 белков (в том числе щелочной фосфатазы), но одновременно стимулируется синтез других (например, репрессора *lac*-оперона), а образование некоторых белков ( $\alpha$ -амилазы) остается на прежнем уровне.

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

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

Принципиально иной способ регуляции может быть осуществлен путем внутригеномных перестроек, происходящих вследствие обратимых внутригеномных рекомбинаций, приводящих к дупликациям и амплификациям, делециям, инверсиям.

Внутригеномные перестройки лежат в основе такого чрезвычайно важного явления, как *диссоциация* микроорганизмов (синонимы – фазовые переходы, фазовые вариации). Явление диссоциации заключается в существовании в популяциях генетически одинаковых микроорганизмов субпопуляций, различающихся фенотипически. Наиболее известные примеры – наличие R-, S- и M-диссоциантов патогенных бактерий, хотя есть и диссоцианты, отличающиеся по другим признакам – токсигенности, синтезу антигенных детерминант, ферментной активности.

Одним из наиболее часто встречаемых и наиболее изученных типов таких перестроек являются перестройки с участием подвижных генетических элементов (называемых IS-элементами и транспозонами), которые сначала выщепляются, а затем встраиваются в другие места генома. При этом может меняться характер регуляции транскрипции как генетических локусов, входящих в состав перемещаемых участков, так и соседних с ними локусов. Возможно также встраивание генетического элемента в тот же участок ДНК, откуда он был выщеплен, но в инвертированном виде («задом наперед»). Такая инверсия используется иногда как способ регуляции развития фагов (фага Mu *E. coli*), а также образования жгутиковых антигенов у сальмонелл (рис. 4.7).

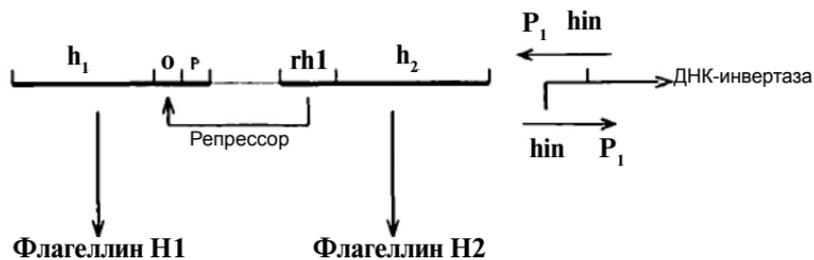


Рис. 4.7. Схема регуляции синтеза флагеллинов у *Salmonella typhimurium* [17]:  $h_1$ ,  $h_2$  – гены, кодирующие флагеллины H1 и H2 соответственно;  $rh1$  – ген-регулятор;  $hin$  – ген, кодирующий ДНК-инвертазу;  $P_1$  – промотор для генов  $h_2$  и  $rh1$

Когда промотор  $P_1$  находится в благоприятной ориентации для транскрипции  $h_2$ ,  $rh1$ , образуется флагеллин H2, а синтез флагеллина H1 блокируется репрессором. При обратной ориентации не образуется ни флагеллина H2, ни репрессора, а транскрипция локуса флагеллина H1 осуществляется с собственного промотора. Изменение ориентации  $P_1$  производится ДНК-инвертазой, кодируемой геном  $hin$ , активность которого не зависит от положения  $P_1$ .

Внутригеномные перестройки лежат в основе такого механизма адаптации бактерий, как увеличение «дозы гена». Суть его в том, что возрастает число определенных генов, как правило, отвечающих за устойчивость к антибиотикам, другим токсичным агентам. Вследствие увеличения количества генов с них транскрибируется больше иРНК и синтезируется больше белка. Плазмида, несущая детерминанту устойчивости и включенная в хромосому, может амплифицироваться, оставаясь в интегрированном состоянии. Например, стафилококковая плазмида  $pC194$ , несущая ген устойчивости к хлорамфениколу, после встраивания в хромосому *B. subtilis* может претерпевать 15-кратную амплификацию (после пассажа бактерии на средах с возрастающими концентрациями антибиотиков). Холерный вибрион типа Эль-Тор после амплификации оперона токсина существенно повышал выработку токсина.

В связи с тем, что генетический материал клетки организован в координированно и регулируемо транскрибируемые единицы (опероны и регулоны), возникает возможность осу-

шествовать регуляцию не отдельных биохимических реакций, а целых групп реакций, метаболических блоков и даже клеточных процессов, фаз развития культур (популяций) микроорганизмов. Такую регуляцию часто называют *глобальной*. Некоторые механизмы глобальной регуляции будут рассмотрены в гл. 5.

## 4.2. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ НА ЭТАПЕ ТРАНСЛЯЦИИ

### 4.2.1. РЕГУЛЯЦИЯ НА ЭТАПЕ БИОСИНТЕЗА И СБОРКИ КОМПОНЕНТОВ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ

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

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

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

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

Аминоацил-тРНК-синтетазы представляют собой довольно крупные (40–400 кДа) белки, чаще всего мультимерные (состоящие из нескольких субъединиц). Число их видов равно числу природных аминокислот. Уровень всех или большинства АРСаз

регулируется координированно и пропорционален скорости роста. Избыток аминокислот не оказывает на синтез АРСаз прямого репрессивного действия. Значительная часть АРСаз эукариот ассоциирована с полирибосомами и организована в *полиферментные комплексы*. Поэтому в отношении их действуют регуляторные механизмы, характерные для управления активностью ферментных ансамблей (см. разд. 4.3).

*Транспортные РНК* составляют около 10–15% всей клеточной РНК и кодируются 50–60 генетическими локусами. Биосинтез тРНК проходит промежуточное образование предшественников, которые затем укорачиваются и модифицируются. Это явление называется *процессингом*, или «созреванием» тРНК. Например, предшественник тирозиновой транспортной РНК (тРНК<sup>тир</sup>) у *E. coli* содержит 129 нуклеотидов, что на 44 нуклеотида больше, чем содержит «зрелая» форма. Такой предшественник можно выделить из температурочувствительного мутанта с дефектом РНКаз. Он подвергается процессингу с участием двух РНКаз: Р и РIII (рис. 4.8).

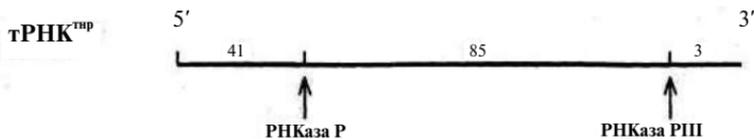


Рис. 4.8. Схема процессинга тирозиновой тРНК

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

Необходимо отметить, что РНКазы Р состоит из РНК (100 – 400 нуклеотидов) и белка, причем РНК сама по себе может выполнять функции фермента, катализируя процессинг, тогда как белок лишь стимулирует ее активность. Таким образом, РНКазы Р является пока не очень многочисленным примером *рибозима*, т.е. фермента, представляющего собой не белок, а РНК.

Следующим этапом процессинга многих тРНК является *модификация оснований*, которая осуществляется при помощи большого количества ферментов (более 60), поскольку даже

одна и та же модификация основания, находящегося в разных участках молекулы тРНК, может осуществляться разными ферментами. Способы модификации на примере уридина приведены на рис. 4.9.

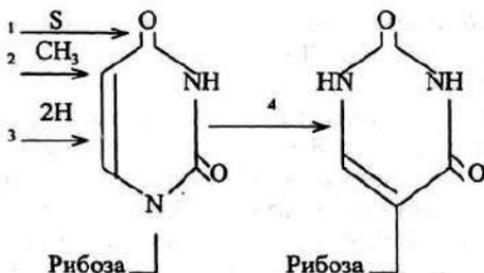


Рис. 4.9. Возможные способы модификации уридина в тирозиновой тРНК :

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

Важно отметить, что в процессе эволюции (при возникновении более высокоорганизованных организмов) количество модифицированных компонентов в тРНК возрастало. Это указывает на важную регуляторную роль модифицированных изоакцепторных тРНК. (Изоакцепторными называются тРНК, различающиеся по структуре, но переносящие одну и ту же аминокислоту к рибосомам.)

Далее рассмотрим гипотезы, касающиеся возможных механизмов регуляции трансляции, основанных на использовании изоакцепторных тРНК.

Рибосомные РНК у эукариот представлены четырьмя типами: 28S, 18S, 5,8S и 5S, у прокариот — тремя: 23S, 16S и 5S. Кроме того, в митохондриях и хлоропластах эукариот содержатся рибосомы, близкие по составу к прокариотическим. Геном *E. coli* содержит 6–7 оперонов, включающих локусы всех трех рРНК, а также разное число локусов тРНК. В процессе транскрипции синтезируется общий транскрипт, подвергающийся процессингу (рис. 4.10), который осуществляется в ходе транскрипции, так что общий транскрипт длиной 5600 нуклеотидов может быть выделен только в системе *in vitro* или у мутантов с дефектом РНКаз.

РНКаза III (эндонуклеаза) «узнает» двухнитевые участки («чешушки петель»), соответствующие границам локусов транскрибируемых РНК. После действия РНКазы III образуются не «зрелые» молекулы РНК, а их предшественники, которые подвергаются дальнейшему процессингу. В случае рРНК он может состоять, например, в метилировании, которое обычно осуществляется после того, как рРНК включена в состав субчастицы рибосомы.

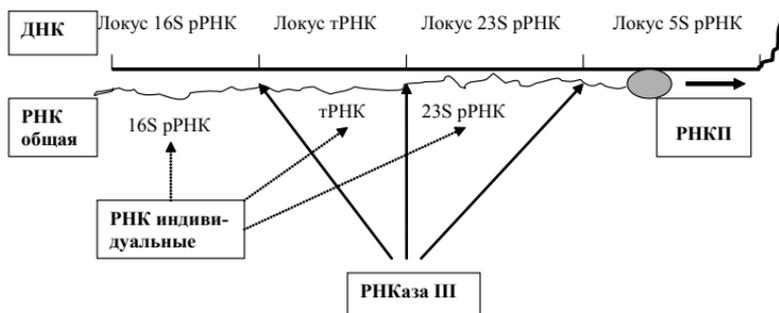


Рис. 4.10. Схема процессинга тирозиновой тРНК

Процессинг осуществляется в ходе транскрипции локусов рРНК: РНККаза III расщепляет общий транскрипт, образуемый РНКП, непосредственно в ходе процесса, сразу после завершения транскрипции очередного локуса

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

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

Синтез рРНК и рибосомных белков регулируется *координированно* и определяется эффективностью работы аппарата трансляции: например, при дефиците аминокислот транскрипция локусов, кодирующих рРНК и рибосомные белки, подавляется одновременно (сигналом служит гуанозин тетрафосфат).

*Информационная (матричная) РНК* у прокариот, как правило, полицистронна, а у эукариот – моноцистронна. Процессинг у эукариот состоит в вырезании интронов (некодирующих по-

следовательностей) и в сплайсинге экзонов (кодирующих последовательностей). Затем происходит метилирование оснований (в среднем иРНК содержит один остаток метилированного аденина на четыреста остатков неметилированного аденина). На конце 3' достраивается специфическая группировка, так называемый «кэп», а на конце 5' последовательность из остатков адениловой кислоты, включающая до 100–400 нуклеотидов. Роль этой последовательности остается неясной. Поступившая в цитоплазму иРНК существует в виде нуклеопротеидного комплекса – информосом и в таком виде может сохраняться длительное время до наступления трансляции.

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

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

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

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

#### 4.2.2. РЕГУЛЯЦИЯ НА ЭТАПЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ

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

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

В некоторых специализированных эукариотических клетках двухцепочечная РНК (например, вирусного происхождения) ингибирует трансляцию, вызывая активацию протеинкиназы, фосфорилирующей фактор инициации eIF-1. Описана также возможность блокирования трансляции у прокариот путем присоединения к инициаторному участку иРНК особой комплементарной регуляторной РНК (mic-РНК). Наконец, существует потенциальная возможность управления скоростью трансляции у прокариот на этапе инициации за счет изменения доступности (количества) инициаторной формилметиониновой тРНК (т РНК<sup>Ф-мет</sup>), которая является обязательной для инициации.

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

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

Другой пример относится к развитию фагов, в процессе которого наряду с изменением процесса транскрипции (см. разд. 4.1) блокируется трансляция иРНК организма-хозяина. В некоторых случаях (у *E. coli*) это связано с модификацией рибосом, перестоящих «узнавать» иРНК хозяина (т.е. блокируется инициация трансляции). Однако у эукариот блокирование обусловлено модификацией факторов элонгации с помощью специальных ферментов, осуществляющих фосфорилирование (в случае фактора EF-1) или ADP-рибозилирование (в случае фактора EF-2), что резко уменьшает сродство данных белков к рибосомам.

Что касается терминации трансляции, то специальные механизмы регуляции в этом случае не обнаружены (если не считать облигатной зависимости процесса от GTP). Но не-

обходимо указать на возможность «проскакивания» рибосомы через некоторые «слабые» терминирующие кодоны (например, UGA), что, с одной стороны, позволяет рибосоме транслировать полицистронные матрицы без диссоциации от иРНК, а с другой – обеспечивает образование небольшого количества более длинных полипептидов, способных выполнять важную функциональную роль (например, при сборке фага Q $\beta$ ).

### **4.2.3. РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ ПУТЕМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ**

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

У прокариот наиболее распространенным видом процессинга белков является удаление «сигнального» пептида из молекул секретируемых белков. Такие белки и ферменты (экзогидролазы, белки наружной мембраны и др.) содержат на NH<sub>2</sub>-конце гидрофобный пептид из 15–30 аминокислот, который необходим для транслокации белка через цитоплазматическую мембрану в процессе его синтеза. После завершения транслокации «сигнальный» пептид удаляется специальной «сигнальной» пептидазой (подробнее об экзоферментах см. в разд. 3.7).

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

#### 4.2.4. РЕГУЛЯЦИЯ КРУГОВОРОТА БЕЛКОВ ПУТЕМ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ПРОТЕОЛИЗА

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

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

Механизм «узнавания» аномальных или нефункциональных белков неизвестен. Скорее всего, важную роль в нем играют особенности третичной структуры белков, и замена даже одной аминокислоты сильно снижает устойчивость белка к внутриклеточному протеолизу. Последнее обстоятельство может существенно мешать получению микроорганизмов — сверхпродуцентов, у которых повышенное образование целевого продукта обусловлено мутациями по соответствующим ферментам. Такие ферменты будут восприниматься системой узнавания как аномальные и подвергаться протеолизу, что тормозит биосинтетические процессы, а иногда и рост микроорганизма.

Специфический (АТФ-зависимый) протеолиз может дополнять регуляцию по механизму катаболитной репрессии. Например, у некоторых дрожжей глюкоза не только репрессирует синтез определенных ферментов (малатдегидрогеназы, ФЕП-карбоксилазы), но и стимулирует их протеолитическую деградацию – по-видимому, за счет индукции или активации соответствующей протеиназы.

Решающую роль играет протеолиз в так называемой *SOS-регуляции*, т.е. в активации SOS-регулона, включающего около 20 генов, которые индуцируются в ответ на некоторые повреждения ДНК и образуют продукты, участвующие в ее репарации. Среди этих продуктов присутствует белок RecA, который участвует в ряде клеточных процессов (рекомбинации, расщеплении АТФ и продуктов деградации ДНК), и подвергает протеолитическому расщеплению белок LexA, репрессор SOS-оперона. Таким образом, при появлении в клетке продуктов деградации ДНК активируются процессы ее репарации.

Особый класс белков (интеины) способен осуществлять белковый аутосплайсинг, т.е. самовырезание своей молекулы из полипептидной цепи-предшественника. Функции интеинов в клетке неизвестны.

## **4.3. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ**

### **4.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

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

### 4.3.2. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ПОСРЕДНИКОВ ПУТЕМ ИХ КОВАЛЕНТНОЙ МОДИФИКАЦИИ

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

У эукариот самым распространенным способом модификации является фосфорилирование. Один из наиболее изученных примеров – процесс синтеза и распада гликогена (рис. 4.11).

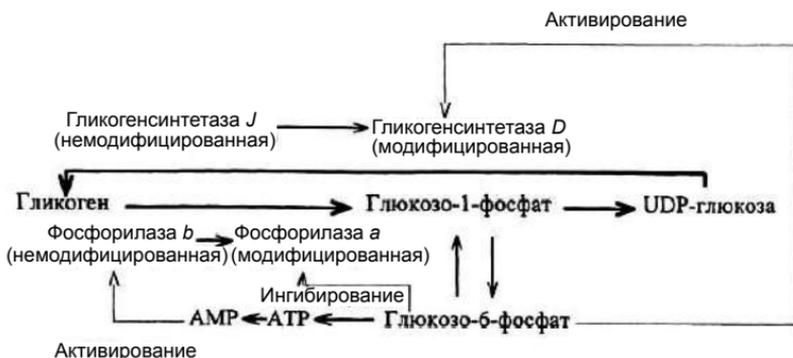


Рис. 4.11. Схема синтеза и распада гликогена

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

Фосфорилирование ферментов, участвующих в синтезе и распаде гликогена, осуществляется киназами, которые сами активируются сАМР. Как уже отмечалось, концентрация сАМР в клетке обратно пропорциональна концентрации АТР. Следовательно, потребность в энергии (накопление сАМР) приводит к фосфорилированию указанных ферментов, т.е.

к стимуляции гидролиза гликогена и торможению его синтеза. Дополнительная стимуляция гидролиза достигается за счет активирующего эффекта АМР, который накапливается при снижении энергетического заряда клетки (дефиците энергии). Напротив, при накоплении глюкозо-6-фосфата, что свидетельствует об активном протекании энергетических процессов (гликолиза), гидролиз гликогена тормозится.

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

Однако наиболее изученным примером регуляции путем ковалентной модификации является аденилирование и уридилирование ферментов в системе регуляции активности глутаминсинтетазы (ГС) (рис. 4.12).

Указанная регуляция активности ГС дополняется регуляцией на уровне биосинтеза фермента: немодифицированный белок РII через другие специальные белки подавляет транскрипцию локусов ГС. В свою очередь, эти белковые регуляторы могут фосфорилироваться с участием специфических протеинкиназ и изменять свою регуляторную активность.

Все эти события – яркий пример каскадной регуляции – наиболее эффективного механизма регуляции сложных метаболических путей, каким и является, в частности, азотный метаболизм.

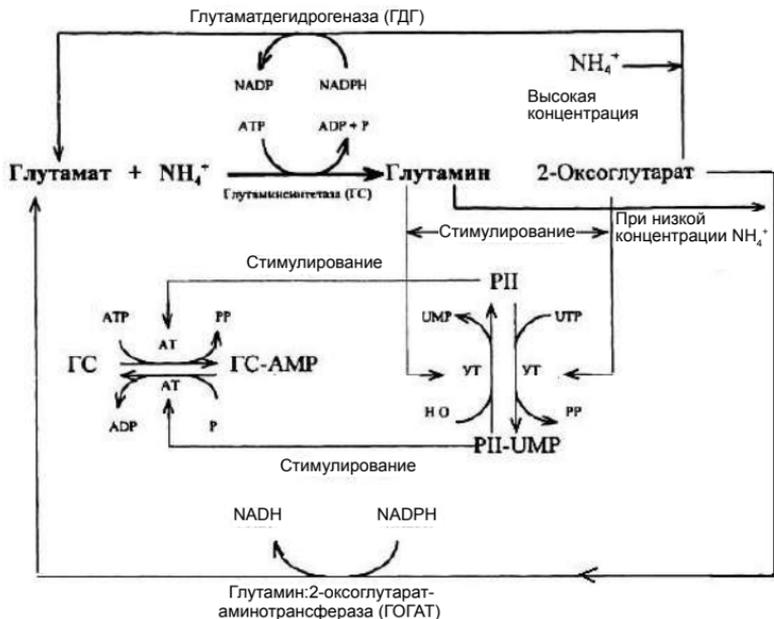


Рис. 4.12. Схема регуляции глутаминсинтетазы (глутамин: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы (ГОГАТ))

Активность глутаминсинтетазы, состоящей из 12 субъединиц, регулируется аденилированием (присоединением 12 АМР) и деаденилированием, катализируемым аденилилтрансферазой (АТ). В аденилированной форме ГС менее активна и зависит от  $Mn^{2+}$ , а не от  $Mg^{2+}$ . В свою очередь активность АТ регулируется белком РИ, который может находиться в уридилированной или деуридилированной форме. Их образование катализируется уридилилтрансферазой (УТ). Уридилирование РИ стимулируется 2-оксоглутаратом (накапливающимся при недостатке азотного питания), в результате чего ГС активируется, так как РИ-UMP стимулирует образование активной, немодифицированной формы ГС. Напротив, при избытке азотного питания накапливается глутамин, который стимулирует переход РИ в немодифицированную форму, стимулирующую аденилирование ГС, что снижает активность последней

### 4.3.3. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ПОСРЕДНИКОВ ПУТЕМ НЕКОВАЛЕНТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЭФФЕКТОРАМИ

1. *Взаимодействие с субстратами.* Ферменты, активность которых регулируется субстратом, должны иметь несколько активных центров, сходных по природе и взаимодействующих между собой (гомotropная кооперативность). Здесь возможны два случая (рис. 4.13):

а) присоединение первой молекулы субстрата облегчает присоединение последующих молекул, и скорость реакции растет по экспоненциальному закону (положительная кооперативность). График зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата имеет S-образную форму (рис. 4.13, а);

б) присоединение первой молекулы субстрата затрудняет присоединение последующих молекул, и с повышением концентрации субстрата происходит замедление возрастания скорости реакции (отрицательная кооперативность) (рис. 4.13, б).

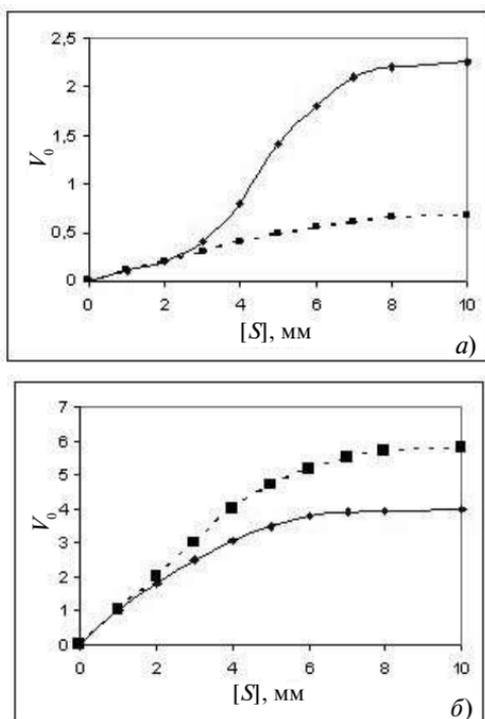


Рис. 4.13. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата Штриховой линией указан ход кривой в отсутствие кооперативности (зависимость Михаэлиса–Ментен). Сплошная линия – зависимость в случае наличия положительной кооперативности (а) или отрицательной кооперативности (б)

Аналогичные механизмы регуляции действуют при трансмембранном транспорте некоторых субстратов (подробнее об этом см. разд. 3.7).

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

а) в анаболических (конструктивных) процессах конечный продукт метаболического пути, накапливаясь выше определенного уровня, подавляет свой биосинтез, ингибируя активность первого (или одного из первых) фермента данного пути («ретро-ингибирование», или *feed-back inhibition*) (рис. 4.14);



Рис. 4.14. Регуляция изолейцином своего биосинтеза из треонина по механизму отрицательной обратной связи

б) в катаболических (энергетических) путях метаболизма отрицательными эффекторами часто служат соединения, являющиеся аккумуляторами энергии (АТФ, РЕФ и т.д.), а другие компоненты аденилатной системы (АДР, АМР) могут выступать в качестве положительных эффекторов (рис. 4.15).

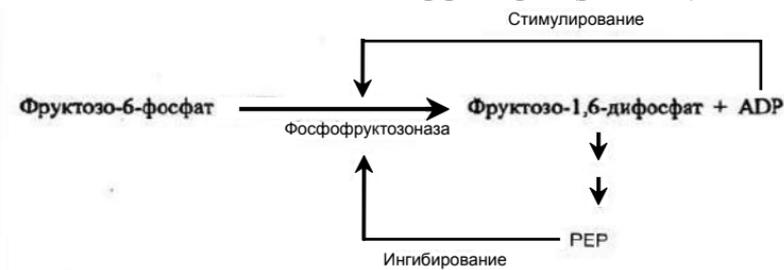


Рис. 4.15. Регуляция гликолитического пути отрицательными и положительными эффекторами

Таким образом, активность данных ферментов зависит от энергетического заряда клетки;

в) амфиболические ферменты, участвующие как в конструктивных, так и в энергетических процессах, могут регулироваться с помощью обоих механизмов (рис. 4.16);

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

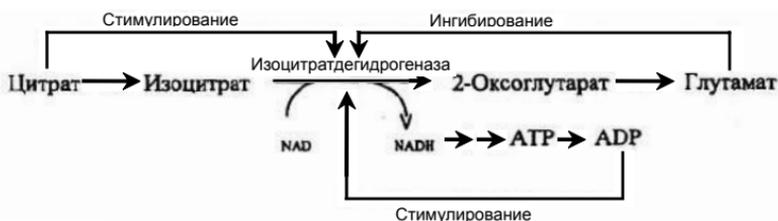


Рис. 4.16. Регуляция амфиболического фермента, изоцитратдегидрогеназы, по типу анаболических ферментов (глутаматом) и катаболических ферментов (ADP)

1. Образование изоферментов (изозимов), катализирующих начальную стадию пути, активность каждого из которых избирательно подавляется только одним из конечных продуктов. Примером может служить биосинтез ароматических аминокислот у *Escherichia coli*, в котором конечные продукты – тирозин, триптофан и фенилаланин, подавляют каждый активность одной из альдозаз, катализирующих первую реакцию пути (рис. 4.17).

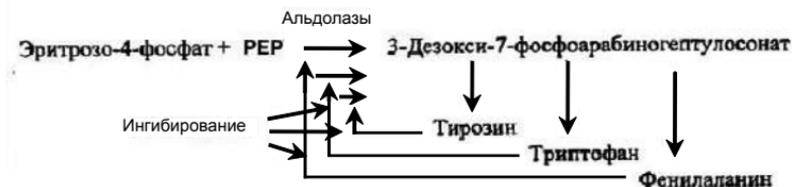


Рис. 4.17. Регуляция разветвленного пути по механизму отдельного ингибирования изоферментов (альдозаз, регулируемых тирозином, триптофаном и фенилаланином) каждым из конечных продуктов

2. Использование ферментов, имеющих несколько взаимодействующих регуляторных центров, каждый из которых специфичен только для одного из эффекторов. По отдельности они не оказывают существенного влияния на активность фермента, а при их совместном действии активность подавляется. Это так называемое согласованное, или мультивалентное, ингибирование. Например, активность аспартаткиназы у *Escherichia coli* подавляется только сочетанием лизина, метионина и лейцина (изолейцина). Для глутаминсинтетазы обнаружено восемь кумулятивных эффекторов: аланин, глицин, гистидин, триптофан, ЦТР, АМР, карбамоилфосфат, глюкозамин-6-фосфат.

#### 4.3.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ НЕКОВАЛЕНТНЫМИ МОДИФИКАТОРАМИ

К рассматриваемому типу регуляции активности ферментов, без их ковалентной модификации, относится недавно открытый способ регуляции активности ферментов с участием низкомолекулярных микробных ауторегуляторов широкого спектра действия. Описанные первоначально как факторы  $d_1$  и  $d_2$  (differentiation), эти факторы по химической природе являются ненасыщенными жирными кислотами ( $d_2$ ) и производными оксибензолов ( $d_1$ ). Фактор  $d_2$  повышает текучесть мембраны и при низких концентрациях повышает активность мембранных ферментов (дыхание и др.). При высоких концентрациях мембрана становится чрезмерно текучей, ассоциированные с ней белки перестают функционировать. Факторы  $d_1$  при их низких концентрациях в среде также активируют ферменты. При повышении концентрации эффект зависит от их свойств. Более гидрофобные аналоги при повышении концентрации ингибируют активность ферментов, в то время как гидрофильные продолжают активировать ферменты. Все факторы  $d_1$  значительно повышают устойчивость ферментов к повреждающим воздействиям.

Для данной группы регуляторов характерно действие на все белки клетки (всех клеток популяции). Тем самым они представляют один из примеров глобальной регуляции, когда ре-

гулируется активность всех клеток популяции. С участием факторов  $d_1$  осуществляется переход клеток в состояние покоя (споры, цисты), в котором клеточные ферменты не проявляют активности, устойчивы к повреждающим воздействиям и при этом находятся в состоянии «боевой готовности», т.е. при отмыве клеток от факторов  $d_1$  (разбавлении свежей средой) ферменты начинают функционировать еще до того, как пройдут процессы транскрипции и трансляции.

#### **4.3.5. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ПОСРЕДНИКОВ ПУТЕМ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАЗОБЩЕНИЯ**

Механизмы, включающие пространственное разобщение (так называемая компартментация) более распространены у эукариот (см. разд. 1.2) в связи с локализацией ферментов в субклеточных органеллах — митохондриях, лизосомах и т.д. Однако и в клетках прокариот возможны определенные виды компартментации:

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

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

Существует представление о «метаболоне», т.е. комплексе ферментов, закрепленных на подложке (например, на структурном белке). Каталитические свойства в этом случае прояв-

ляются внутри ансамбля, а подложка реагирует на регуляторное действие эффекторов. Например, ни один из ферментов в одиночку может не реагировать на данный эффектор, но в ансамбле, за счет конформационных изменений подложки, они становятся к нему чувствительными

#### **4.3.6. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ПОСРЕДНИКОВ ПУТЕМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МЕМБРАНАМИ**

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

Необходимо отметить одну чрезвычайно важную особенность ферментных белков, связанную с регуляцией их активности в живой клетке. Активность ферментов в клетке (по крайней мере, большинства из них) находится *не на максимальном уровне*, как это иногда себе представляют, а на промежуточном. Это необходимо для того, чтобы клетка могла оперативно и адекватно изменять активность ферментов как в сторону повышения, так и понижения, тем самым оптимизируя метаболизм под условия среды.

Основные способы регуляции процессов метаболизма приведены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

## Основные способы регуляции процессов метаболизма и природа эффекторов

Тип процесса	Биосинтез белков				Активность белков		
	Индукция	Репрессия	Катаболическая репрессия	Аттенуация	Гомотропная кооперативность	Гетеротропная кооперативность	Некооперативные неспецифические
Энергетический	Да, субстрат, аналог(+)	Нет	Да, более выгодный субстрат	Нет	Да, субстраты (+),(-)	Да, АТР (-). АМР, АДФ(+)	Да
Конструктивный	Нет	Да, конечные продукты(-)	Нет	Да, конечные продукты (-)	Нет	Да, конечные продукты (-)	Да
Амфибилический	Иногда	Иногда	Иногда	Иногда	Да, субстраты, аналоги (+)	Да, конечные продукты (-) АТР (-) АДФ (+)	Да

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

## Глава 5

# МЕХАНИЗМЫ ГЛОБАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА

### 5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Метаболические процессы у всех живых организмов адекватно отвечают на изменение условий окружающей среды. Прослеживание этих изменений является необходимым условием выживания (по крайней мере) одноклеточных организмов. Механизмы такого контроля могут быть сравнительно простыми, как, например, в случае индукции и репрессии (см. разд. 4.1.), когда внутриклеточные метаболические процессы прямо реагируют на изменение концентрации действующего фактора. В более сложных случаях включается механизм переноса внешнего сигнала через цитоплазматическую мембрану с последующей его передачей на определенный участок генома или органеллу (например, жгутик). Эти многоступенчатые механизмы предполагают наличие специального аппарата (*signal transduction system*), включающего мембранные рецепторы сигналов, а также белки, переносящие сигнал (*signaling proteins*). В процессе передачи сигнала, как правило, происходит ковалентная модификация белков (метилование, фосфорилирование, гомодимеризация). Такого рода регуляцию принято называть *глобальной*. В ней участвуют как *опероны* и *регулоны* (группы оперонов), контролируемые общим регуляторным белком, так и *модулоны*, включающие несколько оперонов (до 50) и несколько белковых регуляторов, из которых один является главным.

Входящие в модулон опероны и регулоны могут кодировать независимые процессы, однако результатом их совместного действия является быстрая реакция на внешний сигнал.

Примером регуляции последнего типа может служить *хемотаксис* и другие тактические реакции, в результате которых организм (или его часть в случае многоклеточных организмов) перемещается в наиболее благоприятную для него зону (положение в пространстве).

Важную роль в механизмах глобальной регуляции играют циклические и полифосфорилированные нуклеотиды (цикло-АМР, гуанозинтетрафосфат и др.). Примеры основных систем глобальной регуляции приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

### Примеры процессов глобальной регуляции у бактерий

Системы регуляции	Опероны, регулоны и модулоны, а также кодируемые ими регуляторные процессы
<i>Ответ на стрессовые воздействия</i>	
1. SOS-регуляция	Репарация повреждений ДНК, в которой участвует более 20 генов
2. Тепловой шок, холодовой шок  Осмотический шок	Стабилизация биополимеров клетки с помощью «белков теплового шока» (шаперонов) и др.  Синтез осмопротекторов и др.
3. «Голодный» шок  Лимитирование источников фосфора	Переживание клеток в условиях голодания с помощью систем <i>CreC</i> , <i>RpoS</i> и др.  Мобилизация неорганических и органических источников фосфора посредством регулона <i>Pho</i> и др.

Окончание табл. 5.1

<b>Системы регуляции</b>	<b>Опероны, регулоны и модулоны, а также кодируемые ими регуляторные процессы</b>
<i>Регуляция центральных метаболических путей</i>	
4. Кислородная регуляция	«Обезвреживание» активных форм кислорода, в котором участвуют системы OxyR, SoxR и др. Экспрессия генов аэробноза и анаэробноза (NarX, Nir, Fnr) и др.
5. Метаболизм источников углерода с участием цАМФ	Катаболитная репрессия и транспорт сахаров с помощью ФТФ-системы
6. «Вторичный» метаболизм	Системы, определяющие двухфазность роста микроорганизмов и синтез ими «вторичных» метаболитов, в том числе антибиотиков
<i>Цитодифференцировка и сходные с нею процессы</i>	
7. Образование эндоспор и других покоящихся форм	Активация оперонов, участвующих в спорообразовании (Spo, Div, Kin) и др.
8. Формирование биопленок и других «социальных» структур у микроорганизмов (плодовых тел и др.)	Активация множественных регулонов с участием факторов «quorum sensing», приводящих, в частности, к формированию биопленочного фенотипа
9. «Запрограммированная» смерть клеток	Активация сигнальных факторов, запускающих апоптоз (TNF $\alpha$ , Fas-L, P53, каспазы)

Подробно механизмы глобальной регуляции рассматриваются в фундаментальных курсах биохимии (см. список литературы). Из этих проблем мы затронем только три, представляющие наиболее общий интерес и, как правило, слабо освещаемые в учебниках: механизмы кислородной регуляции, механизмы запрограммированной смерти клетки (апоптоз), а также регуляцию в структурированных сообществах (био-пленках).

## **5.2. МЕХАНИЗМЫ КИСЛОРОДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА У МИКРООРГАНИЗМОВ**

### **5.2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ КИСЛОРОДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ**

В ответ на любое воздействие внешней среды в клетке происходит изменение экспрессии многих генов. Такой эффект является частью комплекса «глобальной регуляции метаболизма» и опосредуется сигнальными (или сенсорными) системами. Изменение парциального давления кислорода в среде также является стрессовым воздействием. Гены, экспрессия которых меняется в зависимости от уровня кислорода, условно можно разделить на две группы: гены аэробноза (их экспрессия максимальна в аэробных условиях) и гены гипоксии (их экспрессия максимальна в микроаэробных и анаэробных условиях). Гены, экспрессия которых изменяется в зависимости от парциального давления кислорода, составляют значительную часть генома.

Большинство компонентов дыхательных цепей, а также белков, участвующих в аэробном метаболизме (например, ферментов, защищающих клетку от активных форм кислорода – АФК), кодируется генами аэробноза. Однако значительное число генов, индукция (или дерепрессия) которых происходит при переходе к условиям гипоксии и аноксии, также кодируют белки, участвующие в метаболических путях, зависящих от кислорода. Это, в частности, альтернативные оксидазы электрон-транспортной цепи, а также редуктазы и десатуразы, участвующие в биосинтезе гема, стероидов и ненасыщенных жирных кислот. Вероятно, индукция/дерепрессия этих генов необходима для увеличения

эффективности соответствующих путей метаболизма в условиях нехватки кислорода. Такое повышение эффективности может происходить путем увеличения либо скорости использования кислорода, либо сродства к нему.

Гены аэробноза (а также гипоксии) не составляют отдельный регулон или оперон – они разбросаны по геному и в большинстве случаев регулируются независимо друг от друга. Существует несколько общих факторов/механизмов регуляции, позволяющих быстро и эффективно переключаться с аэробного пути метаболизма на микроаэробный и далее – на анаэробный). Кроме того, каждый из этих генов может регулироваться дополнительными факторами, не входящими ни в одну из систем регулонов.

### 5.2.2. Кислородная регуляция у дрожжей

Система кислородной регуляции экспрессии генов лучше всего изучена у *Saccharomyces cerevisiae*. Многие исследователи используют этот эукариотный микроорганизм как модельный для изучения кислородной регуляции, поскольку *S. cerevisiae* способен к росту как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В сочетании с регуляцией экспрессии генов углеродными субстратами кислородная регуляция позволяет эффективно использовать источники углерода и получать энергию в аэробных (дыхание + брожение) и анаэробных (только брожение) условиях.

У дрожжей влияние кислорода на экспрессию генов опосредовано несколькими сигнальными системами. Наиболее изученной является система, в которой центральную роль играет гем. Также известна система, в которой роль сигнального элемента и общего регулятора факторов транскрипции играет эргостерин. Существуют и другие пути кислородной регуляции в клетке. Все они взаимозависимы и тесно переплетаются.

### 5.2.3. Роль гемов в кислородной регуляции

Гемы – простетические группы цитохромов и некоторых кислород-связывающих белков, например каталазы. Выполняют множественные регуляторные функции в клет-

ках микроорганизмов, в том числе являются частью кислородной сигнальной системы у дрожжей. Образование и функционирование гемов тесно связано с молекулярным кислородом. В частности, кислород необходим для их биосинтеза. Фермент копропорфириноген-III-оксидаза использует кислород для образования протопорфириногена-IX, а протопорфириноген-IX-оксидаза использует кислород для образования протопорфирина. При этом этап синтеза с участием копропорфириноген-III-оксидазы является скоростью-лимитирующим. В результате концентрация гема в клетке пропорциональна концентрации кислорода (выше уровня 0,1 мМ). Все ферменты, участвующие в биосинтезе гема синтезируются в клетке конститутивно, даже в анаэробных условиях, поэтому при переходе от этих условий к аэробным синтез гема начинается немедленно.

У *S. cerevisiae* гем активирует ядерные гены, кодирующие элементы кислородной дыхательной цепи, в том числе *cox 5a*, *cox 6*, *cox 7*, *cox 8*, *cox 9* (субъединицы цитохром-с-оксидазы), *sus1* (аэробная изоформа цитохрома с), *cor1*, *cor2*, *cor5* (убихинол-цитохром-с-редуктаза), *cyb2* (цитохром b2), *cyt1* (цитохром c1), *aac1*, *aac2* (аэробные изоформы митохондриальной аденинтрансферазы), митохондриальные гены *coxI* и *coxII*. К гемозависимым генам аэробнозиса у *S. cerevisiae* относятся также гены ответа на окислительный стресс *ctt1*, *cta1* (цитозольная и пероксисомальная формы каталазы), *sod1*, *sod2* (Cu, Zn-супероксиддисмутаза, Mn супероксиддисмутаза). Транскрипция гена *cta1* также регулируется (репрессируется) глюкозой.

Гем активирует ген *tif51a* (аэробная изоформа фактора инициации трансляции eIF5A), *gox1* (репрессор генов гипоксии) и др. и подавляет транскрипцию генов *cox 5b* (субъединица Vb цитохром-с-оксидазы), *sus7* (анаэробная изоформа цитохрома с), *aac3* (анаэробная изоформа митохондриальной аденинтрансферазы). К гемозависимым генам гипоксии относятся *erg11*, *cpr1*, *hmg2* (синтез стероидов), *ole1* (синтез жирных кислот), *hem13* (кодирует копропорфириноген-III-оксидазу – фермент скоростью-лимитирующей стадии биосинтеза гема), *anb1* – (анаэробная изоформа фактора инициации трансляции eIF5A).

#### 5.2.4. РОЛЬ СТЕРИНОВ В КИСЛОРОДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Синтез эргостерина, как и синтез гемов, требует присутствия кислорода.

Опосредованная эргостерином кислородная регуляция изучена гораздо слабее, чем регуляция, опосредованная гемами. Тем не менее известно, что эргостерин играет большую роль в кислородной регуляции у дрожжей. Например, в клетках *Schizosaccharomyces pombe* около 1/3 генов гипоксии предположительно регулируется эргостерином (по принципу отрицательной обратной связи) и примерно такое же количество генов у *S. cerevisiae*.

#### 5.2.5. ДРУГИЕ ПУТИ КИСЛОРОДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Один из возможных путей регуляции процессов в клетке — изменение клеточного редокс-потенциала за счет окисления/восстановления специфических молекул. У дрожжей существенную роль в этом играет глутатион, (НАД), а также цистеиновые остатки в белках. У *S. cerevisiae* при переходе к анаэробным условиям наблюдается существенная активация экспрессии генов *gpd2* (кодирующего анаэробную изоформу глицерин-3-фосфатдегидрогеназы) и *rhr2* (кодирующего ферменты синтеза глицерина), участвующих в поддержании редокс-потенциала, а также генов синтеза трегалозы *tps1*, *tps2*, *tps3*. Все эти гены относятся к редокс-регулируемым.

Индукция синтеза трегалозы необходима для защиты мембранных белков от повышенных концентраций этанола в анаэробных условиях, а синтез глицерина сопряжен с поддержанием редокс-потенциала. Трегалоза и глицерин являются осмопротекторами, поэтому в анаэробных условиях *S. cerevisiae* лучше переносит осмотический стресс.

#### 5.2.6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМ КИСЛОРОДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ДРОЖЖЕЙ

При переходе от аэробнозиса к гипоксии дрожжевая культура проходит через несколько стадий адаптации. Описанные выше специфические системы (с участием гемов или стерингов) игра-

ют ключевую роль на последних стадиях, т.е. при длительном анаэробии. На начальной стадии перехода к гипоксическим условиям значительную роль играют другие факторы регуляции экспрессии. Самые ранние изменения экспрессии генов контролируются системой общего ответа на стресс с участием фактора Msn2/4. Сходные изменения происходят в клетках, подвергающихся различным стрессовым воздействиям (например, голоданию, окислительному стрессу, осмотическому стрессу). Около 60% генов общего ответа на стресс, найденных у дрожжей, являются кислород-зависимыми. В частности, в процессе работы системы Msn2/4 меняется экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм энергетических запасов (гликогена, трегалозы), транспорт и метаболизм альтернативных источников энергии и источников углерода, происходит репрессия синтеза рРНК. Это позволяет полностью адаптировать метаболизм к новым условиям.

### 5.2.7. Кислородная регуляция у прокариот

У бактерий, как и у дрожжей, большую роль в кислородной регуляции играет гем. У прокариот наблюдается значительное разнообразие типов сенсорных белков, содержащих гем. Как правило, это белки, где гем-связывающий сенсорный домен регулирует активность второго домена, представляющего собой чаще всего киназу. В одних случаях связывание гема с кислородом приводит к конформационным изменениям белка, в других случаях значительную роль играет окисление железа в составе гема, в третьих — связывание с кислородом приводит к разрыву связей гема с белком и т.д.

Одной из наиболее изученных систем кислородной регуляции у бактерий является двухкомпонентная система FixL-FixJ, где белок FixL является сенсором и киназой, а белок FixJ — активируемым им регулятором транскрипции. Эта система участвует в активации генов гипоксии у большого числа прокариот. Белок FixL содержит киназный домен и гем-связывающий сенсорный домен (принадлежащий к большой группе PAS-доменов — белков, выполняющих сенсорные функции в самых разных системах регуляции у бактерий и эукариот). Гем высту-

пает в роли кофактора. Гем-связывающий домен регулирует киназную активность FixL. В аэробных условиях гем связывается с кислородом и в результате конформационных изменений киназная активность FixL ингибируется. В условиях гипоксии, когда гем не связан с кислородом, FixL автофосфорилируется и фосфорилирует фактор транскрипции FixJ, что приводит к его димеризации и переходу в активное состояние. В активном состоянии FixJ активирует экспрессию генов гипоксии. В частности, у азотфиксирующих бактерий, которые попадают в условия гипоксии при образовании симбиотических клубеньков, FixJ индуцирует экспрессию генов фиксации азота (*nif*, *fix*), а также генов, кодирующих альтернативные терминальные оксидазы, более эффективные в условиях гипоксии.

Еще один пример гем-содержащего сенсора – система AppA-PpsR у *Rhodobacter sphaeroides*. *R. sphaeroides* – факультативный фототроф, который в присутствии кислорода получает энергию в процессе аэробного дыхания, а в отсутствие кислорода на свету – в процессе фотосинтеза. Запуск фотосинтетического аппарата регулируется системой AppA-PpsR. Белок PpsR действует как репрессор, AppA-сенсор – антирепрессор.

Примечательно, что AppA является не только кислородным сенсором, но и одновременно светозависимым. Для осуществления первой функции используется гем, для второй – хромофор. В данном случае активация AppA достигается за счет распада координационных связей с кислородом гема в молекуле белка.

Хорошо изучена система ArcAB, контролирующая экспрессию генов гипоксии у *Escherichia coli*. Она включает в себя связанную с мембраной протеинкиназу ArcB и цитоплазматический белок ArcA с ДНК-связывающим доменом. В условиях гипоксии чувствительная к кислороду киназа ArcB автофосфорилируется в ответ на снижение потока электронов через дыхательную цепь и далее фосфорилирует белок ArcA, сообщая ему способность связываться с ДНК и регулировать большое число оперонов, в том числе контролирующих катаболизм углерода и внутриклеточный редокс-статус.

Киназа ArcB не взаимодействует с кислородом напрямую; ее автофосфорилирование происходит в ответ на снижение потока электронов через дыхательную цепь. В аэробных условиях

киназная активность *ArcB* ингибируется в результате образования интермолекулярных дисульфидных связей при специфическом окислении хинонами двух редокс-активных цистеиновых остатков в сенсоре.

Белок *ArcB* также относится к группе белков, содержащих PAS-домены. В целом, если экспрессия более 1/3 генов *E. coli* регулируется кислородом, то около 85% из них – при участии системы *ArcAB*. Например, посредством системы *ArcAB* осуществляется репрессия аэробных генов цикла трикарбоновых кислот (*sdhCDAB*, *icd*, *fumA*, *mdh*, *gltA*, *acnA*, *acnB*), генов аэробного метаболизма жирных кислот (регулон *fad*), а также генов, кодирующих аэробные цитохромоксидазные комплексы (например, гена *cyoA*, кодирующего цитохром-о-убихинолоксидазу). По другому механизму *ArcAB* активирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в утилизации пирувата и сбраживании сахаров, а также генов *cydA-cydB*, кодирующих все субъединицы цитохром-*bd*-оксидазы, активируя перенос электронов через цитохром *d*, который имеет высокое сродство к кислороду.

Многие из генов гипоксии у *E. coli* регулируются совместно системой *ArcAB* и белком *Fnr*. В частности, к ним относятся гены *cydA-cydB* (цитохром-*bd*-оксидаза). В аэробных условиях экспрессия *cydAB* минимальна, при переходе к микроаэробным условиям она активируется системой *ArcAB* и достигает максимума, затем, при дальнейшем снижении концентрации кислорода и переходе к анаэробным условиям, *Fnr* подавляет экспрессию *cydAB*. Также совместно *ArcAB* и *Fnr* регулируются гены гипоксии *focA-pflB* (утилизация пирувата), *sdh*, *suc* (сукцинатдегидрогеназа, сукцинил-CoA-синтетаза), *narY* (субъединица нитратредуктазы), *glnE* (глутаминсинтаза), *tynA* (тираминоксидаза), *yabM* (переносчик глюкозы/лактозы), *nanT* (переносчик сиаловой кислоты), *uraA* (транспорт урацила), *rpuC* (транспорт никотинамида), *glgA* (синтез гликогена), *mrcA* (пенициллинсвязывающий белок 1A), *rarD* (устойчивость к хлорамфениколу) и др.

Установлено, что при переходе к условиям гипоксии ответ, опосредованный *Fnr*, развивается гораздо быстрее, но является во многом временным, тогда как ответ, опосредованный системой *ArcAB*, развивается медленнее. Предполагается, что

сочетание в регуляторных системах быстро и медленно реагирующих компонентов характерно для систем, в которых имеет место параллельная регуляция одних и тех же генов несколькими факторами. Это позволяет, с одной стороны, быстро адаптировать метаболизм к кратковременному действию стрессоров (быстрореагирующие компоненты), а с другой стороны, обеспечивает развернутый ответ в случае, если стрессорное воздействие продолжается.

### 5.2.8. КИСЛОРОДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

В большинстве исследований авторы ограничиваются рассмотрением регуляторной роли кислорода как единственного стрессового фактора, влияющего на микробную популяцию. Однако в природных условиях микроорганизмы подвергаются, как правило, одновременному воздействию нескольких стрессовых факторов среды. Например, наряду с гипоксией это может быть высокая концентрация солей, неблагоприятные величины рН и/или температуры.

В серии исследований, проведенных с прокариотными (*Rhodococcus*, *Shewanella*, *Halobacterium*) и эукариотными (*Candida*, *Rhodotorula*, *Dedaryomyces*) микроорганизмами, выделенными из засоленных экотопов (в том числе из пластовых вод нефтяных месторождений), показано, что при сочетании гипоксии с высокой концентрацией солей данные стрессовые факторы вступают в антагонические взаимоотношения. Это приводит к повышению степени галофильности (галотолерантности) микроорганизмов, причем слабогалофильные организмы переходят в разряд умеренно галофильных, а некоторые галотолеранты приобретают свойства галофилов.

Как оказалось, высокая концентрация соли (гиперосмотический шок), кроме осмотических нарушений, подавляет дыхание и нарушает синтез ферментов, защищающих клетку от АФК. Микроаэробные условия (гипоксия), приводящие к снижению парциального давления кислорода, вызывают индукцию (активацию) генов гипоксии, кодирующих компоненты дыхательных цепей и защитные ферменты, менее чувствитель-

ные к действию соли, а также повышают содержание в клетке осмопротекторов. В результате гипоксия ослабляет вредные последствия гиперосмотического шока и повышает степень галофильности (галотолерантности) микроорганизмов.

Таким образом, гипоксия в данном случае выступает как интистрессовый фактор. Взаимодействие запускаемых гипоксией регуляторных механизмов обеспечивает адаптацию клеток к другим действующим стрессовым факторам, что может объяснить высокую частоту изолирования слабогалофильных микроорганизмов из экотопов с низким парциальным давлением кислорода и повышенным содержанием солей (в частности, из пластовых вод нефтяных месторождений).

### **5.3. АПОПТОЗ (ЗАПРОГРАММИРОВАННАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ)**

#### **5.3.1. Основные типы и этапы запрограммированной гибели клеток**

Более восемнадцати веков назад римский врач и естествоиспытатель Гален предложил термин «апоптоз», что в переводе с греческого означает «листопад». Керр с соавторами «реанимировал» этот термин в 1972 г., применив его для описания отмирания тимоцитов в процессе выработки иммунного ответа.

Многочисленные примеры гибели клеток в многоклеточном организме известны давно. Типичными случаями являются процессы элиминирования отдельных тканей в эмбриогенезе позвоночных животных (например, клеток межпальцевых перегородок и т.д.). Другая группа апоптических явлений связана с утратой рудиментарных структур или физиологических функций в процессе онтогенеза организма, например отмирания тканей хвоста в ходе превращения головастика в лягушку или лактацитов молочной железы после прекращения лактации.

Сначала было принято считать, что такая гибель клеток обусловлена простым ухудшением условий окружающей среды или старением тканей. В дальнейшем были расшифрованы молекулярные механизмы апоптоза и стало ясно, что это явление запрограммировано в геноме самих гибнущих клеток.

В настоящее время принято различать несколько типов запрограммированной гибели:

- *митоптоз*— гибель клеточных органелл (на примере митохондрий);
- *органоптоз* — отмирание отдельных органов;
- *апоптоз* — гибель отдельных клеток;
- *феноптоз* — самоубийство целого организма.

Хотя в приложении к одноклеточным микроорганизмам два последних термина выглядят синонимами, следует учитывать, что собственно апоптозом принято называть гибель отдельных клеток *многоклеточного* организма. Поэтому в отношении микроорганизмов правильнее использовать термин «феноптоз».

Другим видом программируемой гибели клетки является *некроз*. В отличие от апоптоза, который вызывается нелетальными воздействиями на клетку, некроз является следствием необратимого повреждения клетки и завершается ее лизисом.

У животных организмов характерными для апоптоза процессами, отличающими его от некроза, можно считать переход фосфатидилсерина из внутреннего монослоя цитоплазматической мембраны в наружный, выход цитохрома С из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму и активация им цистеиновых протеиназ (каспаз), нарушение структуры ядерной ДНК и последующий распад ядра на части, фрагментация клеток с образованием везикул, которые захватываются соседними клетками или макрофагами, как и в случае некроза. Основные различия между апоптозом и некрозом представлены на рис. 5.1.

Рассмотрим подробнее последовательность событий при апоптозе, включающем несколько этапов.

- Поступление сигнала из внешней среды и его рецепция компетентной клеткой.
- Каскадная активация каспаз, специфических Cys-Asp-протеаз. В клетках млекопитающих их присутствует несколько типов, часть из которых активируется в первую очередь и активирует другие эффекторные каспазы. Эффекторные каспазы расщепляют актиновые белки, ингибируют биосинтез белка и активируют ДНКазу.

- Расщепление антиапоптозных белков, т.е. белков, препятствующих активации каспаз, а также иных ингибиторов развития апоптоза.

• Запуск фазы экзекуции, в течение которой и происходит собственно разрушение клетки.

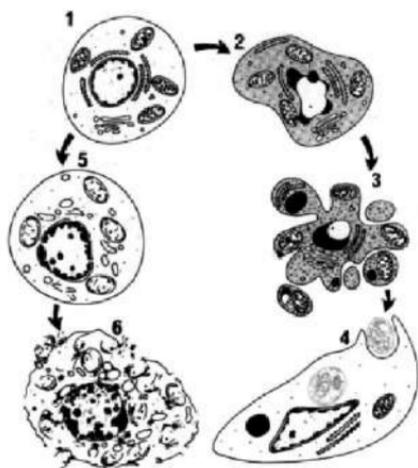


Рис. 5.1. Последовательность событий при некрозе (слева) и апоптозе (справа):

1 – исходная нормальная клетка; 1-2-4 – апоптотический путь; 1-5-6 – некротический путь

Источник: согласно <http://ru.wikipedia.org>

Апоптоз инициируется внешними сигналами. Большинство из них запускают апоптоз, а некоторые – блокируют.

*Сигналы, запускающие апоптоз:*

1. Фактор некроза опухолей ( $\alpha$ -ФНО,  $TNF\alpha$ ) вызывает гибель клеток, содержащих рецептор R1 и запускает один из противоопухолевых механизмов.

2. Fas-лиганд (Fas-L), белок клеточной мембраны Т-лимфоцитов («киллеров»). В виде тримера он связывается с Fas-рецептором клетки-мишени и запускает апоптоз.

3. Белок P53 клеточного ядра, который активируется в результате нерепарабельного разрыва ДНК и, в свою очередь, активизирует каспазы. Утрата этого белка способствует ускоренному росту опухолей.

4. Вах-белки, способствующие выходу цитохрома С из митохондрий.

*Сигналы, блокирующие апоптоз:* белки Bcl-2 или родственные им, присутствующие в геноме некоторых вирусов, подавляют апоптоз в инфицированных клетках и способствуют распространению вируса.

Эти процессы и компоненты в схематичном виде представлены на рис. 5. 2.

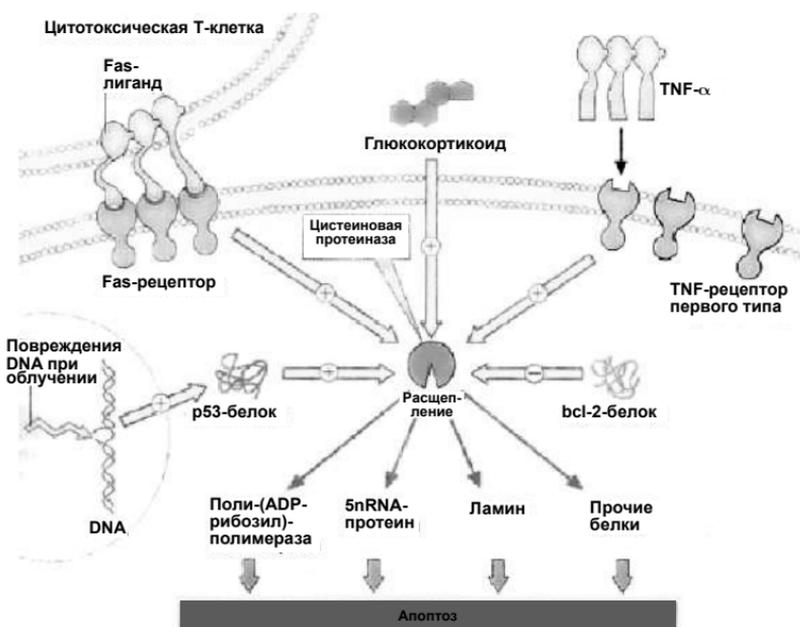


Рис. 5.2. Основные этапы апоптоза в животных клетках

Процесс апоптоза описан у представителей трех царств живого: животных, где он изучен в наибольшей степени, грибов и бактерий. В случае прокариот механизмы запрограммированной гибели клеток имеют специфические особенности. Типичным примером может служить лизис вегетативных клеток при споруляции у бацилл и в процессе образования плодовых тел у миксобактерий. У *Bacillus subtilis* лизис материнской клетки осуществляется ферментами-автолизинами после созревания спор.

У *Mucococcus xanthis* в процессе дифференцировки и образования плодовых тел участвуют, по крайней мере, четыре генетических локуса. Агрегации клеток и образованию плодовых тел предшествует межклеточный обмен сигналами («а-сигнал» содержит аминокислоты и протеазы; «с-фактор» представляет собой белок с молекулярной массой 17 кДа). В лизисе вегетативных клеток участвуют аутоциды — жирные кислоты и производные глюкозамина.

Другим примером апоптоза является гибель клеток, содержащих поврежденную ДНК, а также клеток, инфицированных бактериофагом.

Бактерии (*Escherichia coli*) содержат «страж генома» – белок RecA, напоминающий по функции белок животных P53. При появлении нарушений в структуре ДНК он запускает каскад реакций (рис. 5.3).



Рис. 5.3. Гибель клеток, содержащих поврежденную ДНК или инфицированных бактериофагом

Обнаружив нарушения структуры ДНК, белок RecA атакует другой белок LexA и расщепляет его. В норме LexA подавляет экспрессию генов, кодирующих ферменты репарации и белка SulA. Последний, в свою очередь, образует комплекс с белком FtsZ, необходимым для деления бактерии, и инактивирует его. Таким образом, расщепление LexA стимулирует синтез белков системы репарации и блокирует деление дефектной клетки до тех пор, пока не будут исправлены повреждения ДНК. Если же исправления оказываются невозможными, активируются ферменты автолизина, расщепляющие вещества клеточной стенки, и бактерия погибает.

В некоторых случаях инфицированные фагом бактерии включают механизм «самоубийства», синтезируя специальные белки, – протеазу, активируемую фаговыми белками и расщепляющую фактор элонгации трансляции (EF-Tu), РНКазу, расщепляющую лизиновую тРНК, а также белки RexA и RexB, в комплексе с фаговой ДНК формирующие ионный канал, убивающий бактериальную клетку.

Все большее внимание привлекает запрограммированная гибель бактерий, обусловленная системой «токсин – антитоксин» (или «яд – противоядие»). Такая система состоит из пары

генов, кодирующих стабильный токсин и нестабильный анти-токсин. Типичным примером является механизм поддержания низкокопийных плазмид, в частности полового фактора F. У *E.coli* ген *ccdB* кодирует токсин CcdB, ингибирующий ДНК гиразу, тогда как ген *ccdA* в том же самом опероне кодирует антитоксин CcdA, нейтрализующий токсин. Этот белок быстро расщепляется протеазой (Lon), и дочерняя клетка, не получившая плазмиду F, убивается токсином.

Существует ряд аналогичных систем, предназначенных для поддержания других внехромосомных элементов, необходимых для выживания бактерий. В результате бактерии становятся «зависимыми» от короткоживущего продукта – антитоксина. Из подобных систем наиболее подробно изучена система *mazEF* (рис. 5.4).

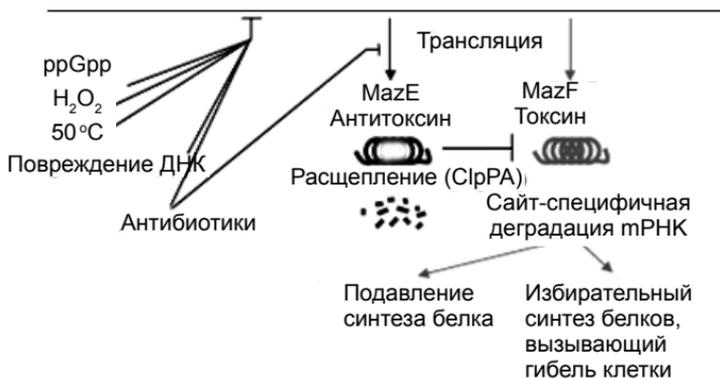


Рис. 5.4. Схема программируемой гибели клетки, опосредуемой системой *MazEF* у *E. coli*

*MazEF* представляет собой генетический модуль, индуцируемый стрессовыми условиями: накоплением гуанозинтетрафосфата (ppGpp), воздействием нагревания или окислителей и, наконец, повреждениями ДНК. Он состоит из двух примыкающих друг к другу генов-*mazE* и *mazF*, кодирующих, соответственно, лабильный антитоксин (*MazE*) и «долгоживущий» токсин (*MazF*). Эти белки подвергаются координированной экспрессии и способны формировать неактивный димер, однако анти-токсин легко расщепляется сериновой протеиназой ClpPA.

Установлено также, что некоторые антибиотики (рифампицин и др.) способны подавлять образование антитоксина на стадии трансляции. Свободный токсин вызывает сайт-специфичное расщепление основной массы информационных РНК, что приводит к подавлению синтеза белка. Кроме того, токсин способствует селективному синтезу «белков клеточной смерти», кодируемых мРНК, нечувствительных к токсину.

### 5.3.2 Персистирующие клетки

Одним из возможных механизмов противодействия программируемой гибели клеток у прокариот является формирование клеток-персистеров (от англ. *persist* – переживать, т.е. переживающих клеток) (см. разд. 5.3).

Впервые «переживающие» клетки обнаружил в 1944 г. Д. Биггер при изучении действия пенициллина на стафилококки. Он доказал, что эти клетки не являются мутантами и при пересеве в среду без антибиотика восстанавливают исходную популяцию. Они получили название «персистеры».

В настоящее время клетки-персистеры обнаружены в большинстве бактериальных популяций. Образование этих клеток определяется фазой роста культуры: в ранней логарифмической фазе роста культуры *E.coli*, *S.aureus*, *P. aeruginosa* персистеры отсутствуют или очень немногочисленны. Их количество увеличивается по мере перехода культур в стационарную фазу.

Механизм, с помощью которого персистеры противостоят действию биоцидов, по-видимому, основан на участии продуктов специальных генов, взаимодействующих по типу токсинов – антитоксинов (рис. 5.5).

Если устойчивость к антибиотику, выражающаяся в повышении его минимальной ингибиторной концентрации, связана с *изменением* (например, мутационным) самой мишени действия антибиотика, то возникновение персистенции обусловлено *блокированием* мишени токсином, в результате чего ошибочный (вредный для клетки) продукт не образуется. При этом минимальная ингибиторная концентрация антибиотика для большинства других клеток популяции не изменяется. Таким образом, блокирование токсином мишени, на которую

воздействует антибиотик, приводит к возникновению небольшого количества физиологически толерантных к антибиотику «покоящихся» клеток. После удаления антибиотика токсин инактивируется антитоксином и персистентные клетки восстанавливают популяцию.

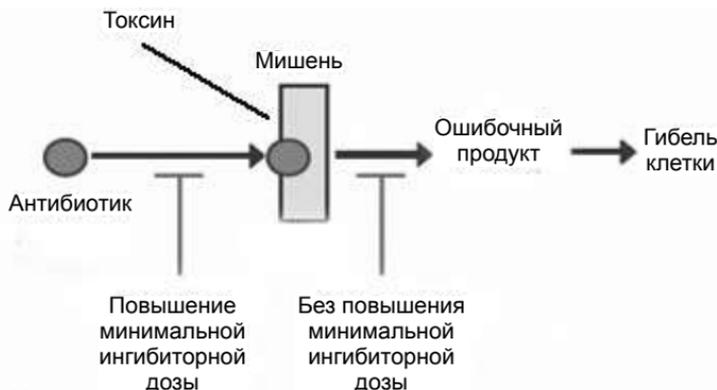


Рис. 5.5. Схема возникновения персистентности в результате блокирования токсинем мишени, чувствительной к антибиотику

Формирование клеток-персистеров можно рассматривать как способ приспособления к меняющимся условиям внешней среды, когда перед популяцией клеток возникает альтернатива выбора стратегии: продолжать размножение с риском погибнуть под влиянием стрессовых условий, либо ценой подавления роста некоторых клеток получить «страховку» от гибели, перейдя в состояние покоя.

Системы модульных генов, кодирующих белки, взаимодействующие по схеме «токсин – антитоксин», представляют собой новый способ глобальной регуляции метаболизма.

Общий вывод о функциях регуляторных систем «токсин – антитоксин» можно сформулировать следующим образом.

1. При воздействии стрессовых факторов (биоцидов) эта система тормозит размножение клеток и может приводить к программируемой их гибели («альтруистский суицид») с целью обеспечения питательными субстратами остальной части популяции.

2. При особых условиях происходит переход части популяции в состояние метаболического покоя различной глубины, что сопровождается увеличением физиологической толерант-

ности к воздействующим стрессовым факторам (биоцидам). Известными формами таких устойчивых клеток являются цистоподобные клетки, клетки-персистеры и так называемые некультивируемые, но жизнеспособные клетки.

В устойчивости структурированных микробных сообществ, биопленок к стрессовым факторам и биоцидам клеткам-персистерам придается существенная (если не решающая) роль. Подробнее о биопленках см. в разд. 5.4.

### 5.3.3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ МЕХАНИЗМОВ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Компоненты систем апоптоза обнаруживаются на самых ранних стадиях эволюции многоклеточных организмов. Уже у губок имеются белки, родственные Bcl-2, и «рецепторы смерти». Ферменты, подобные каспазам, обнаружены у гидры.

Явления, подобные апоптозу, обнаружены и у одноклеточных эукариот. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* АФК вызывают появление каспазоподобной активности, для которой необходимо наличие функциональных митохондрий. Более того, при экспрессии в клетках дрожжей гены проапоптозных белков млекопитающих вызывают типичную программируемую гибель.

До последнего времени в клетках прокариот не было обнаружено белков, гомологичных каспазам, хотя некоторые другие белки апоптоза имеют бактериальные гомологи.

## 5.4. БИОПЛЕНКИ

### 5.4.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Несмотря на различия в определении понятия «биопленки», формулируемого разными авторами, у этих форм существования микроорганизмов можно отметить специфические особенности, которые позволяют классифицировать их как *пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, заключенные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз.*

Как правило, биопленки формируются в *проточных системах*, содержащих необходимые для роста субстраты. По современным представлениям, 95–99% микроорганизмов в природных местах обитания существуют в виде биопленок. Биопленки, сформированные одноклеточными микроорганизмами, могут в дальнейшем заселяться многоклеточными растительными и животными организмами, формируя специфический биоценоз.

### 5.4.2. Роль биопленок в природных экосистемах

Биопленки – это один из видов микробных консорциумов, играющих важнейшую роль в биосферных биогеохимических процессах. Одним из главных факторов, определяющих процессы круговорота биогенных элементов, является молекулярный кислород, подавляющий процессы азотфиксации, денитрификации, восстановления сульфатов и металлов, а также метаногенез. Микроорганизмы, особенно прокариоты, в связи с трудностями внутриклеточной изоляции аэробных и анаэробных процессов вынуждены искать выход в формировании ассоциаций с другими микроорганизмами, которые позволяют находить защиту от негативных последствий воздействия кислорода и особенно его активных форм. В этом заключается одна из причин того, что в природе микроорганизмы существуют в основном в виде структурированных сообществ. Биопленки защищают населяющие их микроорганизмы не только от кислорода, но и от последствий других вредных воздействий окружающей среды.

В соответствии с приведенным определением, биопленки являются микробными сообществами, формирующимися на поверхности раздела фаз. Всего известно четыре типа разделов фаз, на которых развиваются микробные сообщества: жидкость (водная среда) – твердая поверхность, жидкость – воздух, две несмешивающиеся жидкости и твердая поверхность – воздух.

Биопленки, формирующиеся на границе твердой и жидкой фаз (рис. 5.6), могут представлять собой простой слой клеток, без выраженной морфологической дифференциации. Однако чаще они образуют *маты* фотосинтезирующих, метаногенных и сульфатредуцирующих бактериальных сообществ.

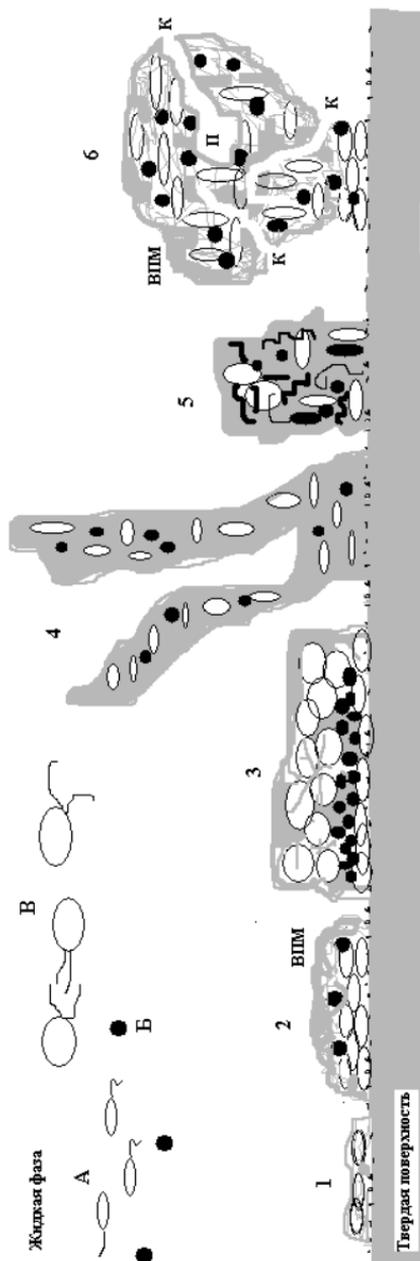


Рис. 5.6. Основные типы строения бактериальных биопленок:

А, Б, В — условные изображения разных микроорганизмов; 1 — слой клеток одного вида, погруженный в матрикс из внеклеточного полимерного материала (ВПМ); 2 — неструктурированная биопленка, составленная из двух или нескольких микроорганизмов, объединенных общим матриксом; 3 — мат — слоистая структура из многих видов организмов с четко выраженной стратификацией, т.е. разделением на морфо-функциональные горизонтальные слои (например, верхний слой фототрофных организмов, средний — гетеротрофов-гидролитиков, нижний — анаэробных автотрофных или гетеротрофных организмов); 4 — биопленка с развитой поверхностью в виде лент (тяжей) из слизистого материала; 5 — зубная бляшка, в состав которой входит много видов бактерий и которая имеет определенную трехмерную структуру и ограничена в пространстве; 6 — «грибовидное» тело с более узким основанием, расширяющееся кверху, составленное многими микроорганизмами. В структуре имеются каналы (К), полости (П) и поры (последнее не показано). В состав такой биопленки могут входить как несколько видов организмов, так и один (*P.aeruginosa*).

Подобные сообщества микроорганизмов развиваются также в сооружениях для очистки сточных вод. Маты представляют собой многовидовое сообщество с выраженной стратификацией соответственно градиенту фактора, регулирующего структуру мата, а именно: для фототрофов – света, для хемотрофов – питательных веществ, окислительного потенциала и др. Этот тип биопленок часто может достигать в толщину нескольких десятков сантиметров.

Особое место занимают зубные биопленки (бляшки), образованные сложным сообществом многих микроорганизмов. Этот тип пленок является одним из наиболее изученных, поскольку его формирование связано с повреждением зубов. Для него описана строгая последовательность колонизации разными микроорганизмами, типы и механизмы взаимодействия организмов. Из зубных биопленок выделены сотни видов микроорганизмов.

Для границы «вода – воздух» описано три морфотипа: примитивный слой на границе воды и воздуха, когда микробы образуют пленку; пленка бацилл на границе «жидкость – воздух», с рыхлой основной частью из цепочек клеток и плодовыми телами, образующими споры и обращенными в воздух; массивные структуры типа чайного гриба (медузомицет, гриб «комбуча»). Сообщество чайного гриба – это симбиоз уксуснокислых бактерий и дрожжей многих родов. Дрожжи включены в полисахаридную строму, образованную бактериями, и вся ассоциация располагается на границе «вода – воздух», достигая толщины нескольких сантиметров.

### 5.4.3. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

Погруженная в природную воду твердая поверхность немедленно покрывается так называемой *первичной пленкой* (англ. *conditioning film*), изменяющей свойства этой поверхности. Формирование такого слоя молекул является первой стадией, предшествующей образованию бактериальной пленки (рис. 5.7).



Затем следуют стадии собственно микробной адгезии — *обратимой адгезии*, когда микроорганизмы обратимо прикрепляются к твердой поверхности, и *необратимой адгезии*, наступающей, когда клетка необратимо связывается с поверхностью. Эта стадия, в свою очередь, состоит из нескольких самостоятельных этапов формирования биопленки. В течение некоторого времени после прикрепления к поверхности клетки могут перемещаться вдоль поверхности посредством жгутиков и пилей IV типа. Затем они теряют подвижность, некоторые из них слипаются друг с другом и начинают выделять внеклеточные полимеры (полисахариды, липополисахариды, гликопротеины), формируя внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ). В результате деления клеток возникают компактные микроколонии, объединенные этим матриксом.

После этого наступает пора *вторичных колонизаторов*, т.е. микроорганизмов, которые прикрепляются к клеткам, локализованным на поверхности. Например, при формировании зубной бляшки первичными колонизаторами являются стрептококки, к которым прикрепляются фузобактерии и затем уже — другие бактерии, всего нескольких сот видов. Одновременно с увеличением толщины биопленки формируются ее специфические структуры — полости, каналы, выросты, поры. Эта стадия нарастания *зрелой биопленки* в благоприятных условиях продолжается достаточно долго. В неблагоприятных условиях наступает последняя стадия — распад, деградация, гибель части клеток и высвобождение остальной части клеток в виде свободноплавающих (планктонных) форм.

В процесс формирования биопленок вовлекается ряд биохимических и генетических механизмов. Специфическим генетическим механизмом можно считать наличие генов, которые реагируют на прикрепление и активны только (или в основном) в биопленках. Несколько генов реагируют на обратимое прикрепление, в то время как необратимое прикрепление вызывает изменение активности уже нескольких десятков генов. У *B.subtilis* образование биопленки регулируется по типу катаболитной репрессии глюкозой. Наличие специфических регуляторных систем биопленкообразования было показано для кишечных бактерий, стафилококков, стрептококков, дрожжей и других микроорганизмов.

Ряд авторов отмечают важность наличия поверхностных структур — жгутиков и пилей IV типа, а также специфических «липких молекул» — лектинов и адгезинов. Адгезины, по-видимому, обеспечивают узнавание поверхности, к которой происходит прикрепление, а также само прикрепление за счет гидрофобных, водородных, ионных и ковалентных связей. Эти молекулы, естественно, локализуются на поверхностных структурах микроорганизмов. Процесс адгезии регулируется также путем образования *антиадгезинов*, специфических внеклеточных метаболитов, предотвращающих обратимую адгезию.

Для развития и функционирования биопленок чрезвычайно важны *межклеточные коммуникации* посредством специфических ауторегуляторов. Например, неспособные к ауторегуляции с участием гомосеринлактонов мутанты *P. aeruginosa* образовывали нетипичные, вырожденные плоские биопленки. Регуляторы другого типа — галогенфураноны, образуемые морскими водорослями, препятствуют формированию бактериальных биопленок. В последнее время доказана важная роль в формировании биопленок циклического — диGMP.

#### 5.4.4. МНОГООБРАЗИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ КОМПОНЕНТАМИ БИОПЛЕНОК

Метаболическая гетерогенность микроорганизмов в биопленках обусловлена многими причинами, из которых наиболее очевидной является пространственная: локализация микробных клеток в различных участках трехмерного матрикса. В этом отношении биопленки принципиально не отличаются от стратифицированных морских и пресноводных осадков. Однако, учитывая меньшую, как правило, толщину биопленок, стратификационные процессы в них обычно выражены не столь заметно.

Тем не менее использование микросенсоров показало, что предпочтительная последовательность акцепторов электронов, присущая осадкам, сохраняется и в пресноводных биопленках. Такие акцепторы располагаются в порядке, соответствующем величине изменения свободной энергии в реакции их восстановления:  $O_2 > NO_3^- > MnO_2 > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2$ . Поэтому в первую очередь используется  $O_2$  (в процессах дыхания, нитрификации и окисления сульфида), а затем  $NO_2^-$  и  $NO_3^-$ , образованные в процессе нитрификации или поступившие из

окружающей среды. Денитрификация может быть сопряжена с окислением сульфида или аммония. Сульфатредукция протекает ниже зоны денитрификации. Наконец, метаногенез пространственно отделен от сульфатредукции и осуществляется в наиболее глубоких зонах биопленки.

В целом распределение функций в биопленке можно в упрощенном виде представить так, как показано на рис. 5.8.

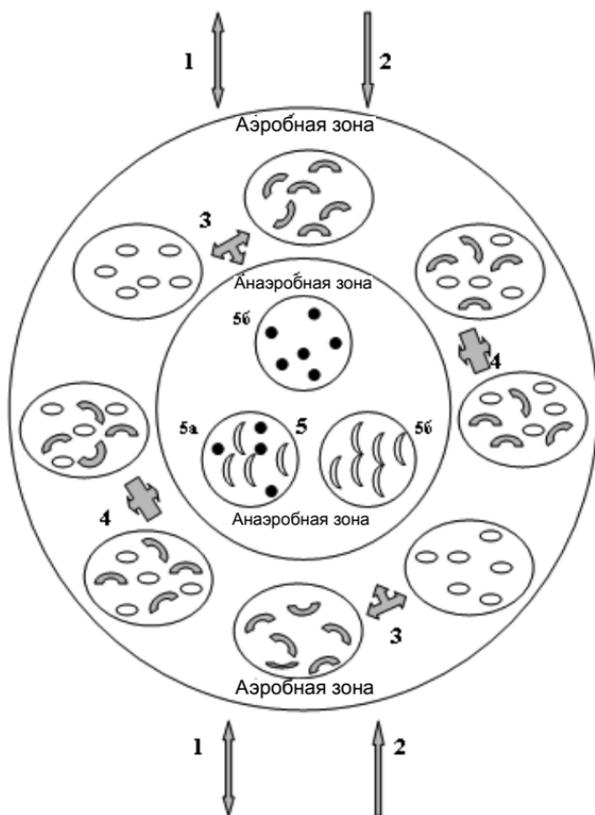


Рис. 5.8. Схема микроразнообразия в микробной биопленке, состоящей из четырех условных микроорганизмов (горизонтальный срез):

1 – поступление органических субстратов и/или  $\text{CO}_2$  и выход продуктов; 2 – поступление кислорода и/или световой энергии; 3 – трофические и сигнальные взаимодействия первичных потребителей/продуцентов с образованием субстратов для анаэробных процессов (с возможным формированием синтрофных ассоциаций – 4); 5 – анаэробные процессы с формированием (5а) или без формирования (5б) синтрофных ассоциаций

Взаимодействие между компонентами начинается уже в процессе формирования биопленки. Многократно было показано, что биопленки, состоящие из микроорганизмов разных таксонов, прочнее и толще, чем биопленки, содержащие микроорганизмы одного вида. Взаимодействие происходит, по-видимому, на стадии формирования внеклеточного матрикса.

В «зрелых» биопленках, в отличие от планктонных культур, конкуренция между видами обнаруживается редко. И даже в том случае, когда один из видов благодаря более высокой скорости роста занимает господствующее положение, второй сохраняет жизнеспособность и высокую численность.

Более редкая разновидность конкуренции — *амменсализм* — может быть обусловлена образованием одним из микроорганизмов агентов, ингибирующих других членов сообщества, а также созданием неблагоприятных физико-химических условий (например, pH). Наиболее часто встречающимися взаимоотношениями между микробными компонентами биопленок являются комменсализм и протокооперация.

*Комменсализм* выражается в одностороннем влиянии одного из компонентов биопленки на жизнедеятельность другого ее компонента. Обычный пример — потребление кислорода аэробным микроорганизмом, способствующее росту микроаэрофильных или анаэробных «сожителей». Этот тип взаимодействия играет важную роль в микробной коррозии с участием сульфатредукторов, локализованных в анаэробных микронихах.

*Протокооперация* приводит к взаимному положительному влиянию компонентов биопленок друг на друга. Такие взаимоотношения существуют, например, в биопленках, содержащих фототрофные и гетеротрофные микроорганизмы. Характерным примером протокооперации является также взаимодействие целлюлолитических бродильщиков и метаногенов. Последние, утилизируя молекулярный водород, а также формиат, образованные в процессе брожения, сдвигают термодинамическое равновесие, предотвращая накопление восстановленных коферментов в клетках бродильщиков и стимулируя синтез ими АТФ.

Предыдущий случай является примером, когда протокооперация переходит в *синергизм*, поскольку оба компонента биопленки получают выгоду от сотрудничества, а образование

или потребление какого-либо продукта в биопленке превышает величину, характерную для индивидуальных популяций. Типичным примером служит гидролиз целлюлозы в биопленке, содержащей как целлюлолитические, так и неспособные к расщеплению целлюлозы микроорганизмы. Последние стимулируют гидролиз целлюлозы и рост целлюлолитиков за счет потребления низкомолекулярных продуктов гидролиза, которые репрессируют биосинтез целлюлоз.

Заметную роль в межклеточных взаимодействиях в биопленках играет обмен генетической информацией, что в определенной степени обусловлено высокой плотностью микробной популяции. Существует множество доказательств того, что горизонтальный перенос генов в биопленках происходит с большей интенсивностью, чем в планктонных культурах. Эффективность горизонтального переноса генов *in situ* убедительно доказана применением сканирующей конфокальной лазерной микроскопии (SCLM) с помощью генов-репортеров (reporter genes), кодирующих флуоресцирующие белки: зеленый (Gfp), красный (Rfp), голубой (Cfp), желтый (Yfp) и синий (Bfp). Более того, удастся не только определить пространственную локализацию мигрирующих плазмид в популяции, но и изолировать соответствующую субпопуляцию методами сортирования клеток.

Кроме метаболической гетерогенности, присущей биопленке как целостной системе и определяемой зональностью биопленок, многие авторы отмечают также существенные особенности в физиолого-биохимических свойствах клеток, входящих в состав биопленок, по сравнению с их планктонными аналогами. В результате возникло представление об особом *биопленочном* фенотипе, выражающемся, в частности, в снижении чувствительности к антибиотикам и токсичным агентам.

Анализ активности отдельных генов, осуществляемый методами *протеомики* (с использованием двухмерного электрофореза белков) позволил установить различия в экспрессии генов при формировании биопленок, а также по мере их созревания. При использовании системы GFP удалось даже пространственно локализовать места синтеза отдельных белков в биопленке. Так, например, показано, что гены *lasI* и *rhlI* *P. aeruginosa*, определяющие синтез факторов «quorum sensing»,

преимущественно экспрессируются в клетках, локализованных на границе раздела твердой и жидкой фаз, причем экспрессия первого гена уменьшается со временем, тогда как второй ген экспрессируется с постоянной скоростью.

Большие перспективы открывает применение для исследования биопленок относительно нового метода *микроматриц* (DNA microarrays), сходного с методом «dot-blotting», но обладающего значительно большими возможностями. Он позволяет определить различия в транскрипционной активности каждого участка генома путем сравнения уровня соответствующих ему мРНК. Например, изучение этим методом экспрессии генов у планктонных и включенных в биопленки клеток *E.coli* показало различия в активности 22 генов, включая гены ответа на стресс (*hslS*, *hslT*, *hha*, *soxS*), ген, ответственный за образование фимбрий (*fimG*), метаболический (синтез аминокислот) ген (*metK*), а также 11 генов с пока не установленными функциями.

#### **5.4.5. Устойчивость к химическим агентам и стрессовым факторам**

Одна из точек зрения на причину формирования биопленок исходит из предположения, что эти структурированные сообщества являются способом защиты микроорганизмов от стрессовых условий. Действительно, микроорганизмы в биопленках более устойчивы к различным стрессовым воздействиям: лимитированию субстратами, изменениям pH, окислению активными формами кислорода. Однако наибольшее внимание исследователей привлекает устойчивость биопленок к антибиотикам и различным биоцидам. Это объясняется в первую очередь важностью таких исследований для медицины, поскольку многие патогенные микроорганизмы образуют биопленки в инфицированном макроорганизме, а также на поверхности различных изделий, имеющих медицинское назначение (катетеров, глазных линз, искусственных клапанов сердца и др.).

По данным разных авторов, не менее 60% инфекций вызывается возбудителями, локализованными в биопленках. Оказалось, что микроорганизмы, входящие в состав биопленок, в отличие от планктонных культур в 100–1000 раз менее

чувствительны к большинству антибиотиков и других биоцидных веществ. Природе этой устойчивости посвящено множество работ. Однако в связи с различиями в применяемых методах и экспериментальных деталях самого процесса получения биопленок взгляды авторов на механизмы этой устойчивости варьируют в широких пределах.

Большое распространение получила точка зрения, что значительную роль в приобретаемой устойчивости играет способность экзополисахаридного матрикса связывать антибиотики.

Несомненно также, что существенный вклад в устойчивость вносят особенности биопленочного фенотипа клеток, выражающиеся в избирательной экспрессии генов устойчивости. К таким генам, в частности у *Ps. aeruginosa*, относят «ген-регулятор ответа на аминокликозиды» (*arr*), кодирующий мембранную фосфодиэстеразу, субстратом которой является «вторичный мессенджер» — циклический дигуанозинмонофосфат, регулирующий степень адгезивности поверхности бактериальных клеток.

Можно сделать вывод, что устойчивость к антибиотикам (и, вероятно, к другим токсичным агентам) в биопленках представляет собой комплексное явление, которое нельзя полностью объяснить каким-либо одним механизмом.

И все же, пожалуй, наибольшее распространение в последнее время получило представление о существовании в биопленках особых персистирующих клеток.

Природа клеток-персистеров остается во многом загадочной. Высказано предположение, что персистеры — это специализированные «переживающие» клетки, возникающие на определенной фазе роста. В стадии логарифмического роста эти клетки присутствуют в незначительном количестве. Они неспособны к делению, поэтому повторные пересевы культуры в этой стадии освобождают популяцию от клеток-персистеров. Полагают, что в клетках-персистерях экспрессируются специфические гены (в частности, ген *hipA*), действующие по модели «токсин — анти-токсин» и блокирующие мишени антибиотиков, что ограничивает рост (переводит клетки в покоящееся состояние), но придает им устойчивость к данным ингибиторам (см. разд. 5.3).

Формирование клеток-персистеров можно рассматривать как способ приспособления к меняющимся условиям внешней среды, когда перед популяцией клеток возникает альтер-

натива выбора стратегии: продолжать размножение с риском погибнуть под влиянием стрессовых условий либо ценой подавления роста получить «страховку» от гибели, перейдя в состояние покоя. Нельзя также недооценивать возможность «переживания» микроорганизмов в биопленках за счет образования других покоящихся форм (например, классических эндоспор), а также формирования ультрамикробактерий (нанобактерий). Однако масштаб и значение этих процессов пока изучены недостаточно.

#### **5.4.6. ЗНАЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК ДЛЯ ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Материалы, изложенные в предыдущих разделах, позволяют оценить важную роль биопленок в природных экосистемах. В последнее время все большее внимание привлекает возможность участия биопленок в процессах, связанных с антропогенным вмешательством в эти системы, а также использования биопленок в биотехнологических процессах.

Особую озабоченность вызывает формирование биопленок, малочувствительных к антибиотикам, в процессе хронических инфекций, в частности кистозного фиброза. Кроме того, нельзя не учитывать, что в природных условиях биопленки могут служить резервуаром, концентрирующим патогенные микроорганизмы, которые, с одной стороны, в этих условиях трудно поддаются дезинфекционным процессам, а с другой стороны, могут быстро приобретать устойчивость к антибиотикам за счет горизонтального переноса генов резистентности.

Большие осложнения вызывает коррозия металлических изделий (в том числе трубопроводов), которая проявляется или ускоряется микроорганизмами, в том числе сульфатовосстанавливающими бактериями. Однако в последнее время получены данные о снижении коррозии в том случае, если на поверхности стальных изделий формируются биопленки из генетически модифицированных микроорганизмов, способных образовывать как ингибиторы коррозии, так и антибиотики, подавляющие рост бактерий, вызывающих коррозию. Например, показано, что биопленки, которые включают *B. brevis*, образующую

грамцидин, защищают металлы от коррозии в присутствии сульфатовсоставляющих бактерий.

Биопленки могут выполнять роль агентов биоконтроля в ризосфере растений, особенно в борьбе с грибными и бактериальными инфекциями. Все большее внимание вызывает возможность искусственного конструирования биопленок в качестве биореакторов. В таких системах можно получать новые физиологически активные продукты.

Наконец, любопытный способ защиты от поедания простейшими обнаружен у некоторых бактерий. Его суть состоит в способности этих бактерий образовывать крупные колонии (или агрегаты) в процессе формирования биопленок, которые оказываются недоступными для эндоцитоза. Это свойство может оказаться полезным при микробиологической биоремедиации почв, а также при формировании ассоциаций (биоаугментации) в процессе очистки сточных вод.

В целом следует отметить, что образование биопленок не всегда учитывается должным образом при оценке роли микробных сообществ в окружающей среде. Между тем точная оценка удельного вклада этих структурированных сообществ необходима как для борьбы с вредным воздействием биопленок, так и для использования их полезных свойств.

#### **5.4.7. Биопленка – «ГОРОД МИКРОБОВ» ИЛИ АНАЛОГ МНОГОКЛЕТОЧНОГО ОРГАНИЗМА?**

Сложность организации биопленок и многообразие взаимоотношений составляющих их микроорганизмов позволили некоторым авторам рассматривать эти структурированные сообщества как аналоги многоклеточных организмов, а входящие в них микроорганизмы – как специализированные клетки, обладающие способностью к кооперативному «альтруистическому» поведению, нарушающему принципы дарвиновской эволюции. В пользу этой концепции свидетельствует также обнаружение у бактерий явления апоптоза – «программируемой смерти клеток», включающего, кроме уже упомянутого механизма «токсин – антитоксин», механизмы с участием аналогов «каспаз», характерные для многоклеточных организмов (см. разд. 5.2).

Однако данная концепция встречает и серьезные возражения, прежде всего потому, что между клетками тканей многоклеточного организма и бактериями существуют фундаментальные различия. Хотя бактерии в биопленке могут адаптироваться к условиям окружающей среды, они не подвергаются перманентной дифференцировке, которая отличала бы их от планктонных культур, и при распаде биопленки возвращаются к исходной планктонной форме. По-другому ведут себя клетки тканей многоклеточного организма, которые, даже когда они культивируются изолированно, сохраняют свойства, присущие клеткам именно данной ткани. В этом случае дифференцировка является необратимой, поскольку не реагирует на сигналы внешней среды.

Основной концепцией развития многоклеточных организмов является векторная модель, предполагающая наличие ключевых «контрольных» точек (checkpoints), после прохождения которых клетки не могут «вернуться вспять» процесс дифференцировки. Напротив, в отличие от дифференцировки тканей процессы формирования (колонизации) и распада биопленок легко обратимы и полностью зависят от сигналов из внешней среды. Таким образом, существует биопленочный фенотип, но не существует биопленочного генотипа.

И все же биопленки нельзя рассматривать только как простую сумму составляющих их клеток. Скорее они представляют собой качественно новый тип сообществ, которые можно рассматривать как «города микробов», формируемые с целью создания различного рода удобств для жителей. Если же существование в таком городе становится некомфортным, жители его покидают. Обитатели такого «города» выбирают удобных для себя соседей, в нем существуют межрайонные коммуникации, а также средства связи и защиты от неблагоприятных условий среды. Можно рассчитывать, что разработка и совершенствование все более тонких методов анализа взаимоотношений между компонентами этих необычных сообществ позволит расшифровать детали их взаимодействия и на этой основе получить инструменты для регулирования их активности в природных и искусственных условиях.

## Глава 6

# ЗНАЧЕНИЕ БИОХИМИИ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 6.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Термин «биотехнология» прочно вошел в круг понятий современного человека, и даже у обывателя, далекого от производственных процессов, создается впечатление, что это одна из последних новинок науки и техники. На самом деле биотехнология недавно отметила свое 90-летие, что для научно-технического направления возраст достаточно солидный. Ну, а если учесть, что зачатки биотехнологических процессов использовались еще на заре человечества, когда многие пищевые продукты и напитки уже производились с помощью микроорганизмов (молочнокислые продукты, хлеб, вино), то биотехнологию можно отождествить с некоторыми палеонтологическими находками на местах древних стоянок первобытных племен.

Конечно, подходы к биотехнологическим процессам в то время были интуитивными и стихийными. Значительно позднее, в середине XIX века научные основы микробиологических производств заложил Л. Пастер. А сам термин «биотехнология» предложил в 1917 г. венгерский инженер Карл Эреки.

Однако если учитывать колоссальный всплеск фундаментально-научных исследований, который произошел во второй половине XX века и вызвал «прорыв» в биотехнологических

процессах, то с полным правом можно говорить о втором рождении биотехнологии, которое наблюдается нынешним поколением. Более того, некоторые эксперты предлагают считать XXI век «веком биотехнологии».

*Биотехнология* – это совокупность методов получения полезных для человека продуктов с помощью живых организмов (вирусов, бактерий, грибов, растений и животных или их клеток), а также с использованием клеточных компонентов (рекомбинантной ДНК, плазмид, ферментов).

В конце XX и начале XXI веков сложились новые направления биотехнологии, хотя производство пищевых (и кормовых) продуктов остается важным ее разделом до сих пор. В настоящее время кроме производства пищевых продуктов можно выделить следующие направления биотехнологии: производство препаратов для медицины, сельского хозяйства, для бытового использования, очистных систем и систем биоремедиации и повышения плодородия почвы. Особое место занимают технологии, используемые в крупнотоннажном производстве, например микробиологические методы выщелачивания металлов, а также методы, способствующие повышению нефтедобычи. В последнее время большое значение приобретает разработка альтернативных источников энергии: биогаза, биотоплива, фотоводорода. Достижения молекулярной биологии и молекулярной генетики настолько глубоко проникли в современную биотехнологию, что можно уже говорить об особом разделе этой науки – молекулярной биотехнологии. Достаточно упомянуть методы клонирования эукариотических генов в клетках прокариот и получение рекомбинантных белков и ферментов; направленный мутагенез и генную инженерию белков; молекулярную диагностику генетических заболеваний; получение моноклональных антител и специфических вакцин. Однако все эти проблемы являются предметом рассмотрения в специальной литературе, приведенной в конце главы. Мы рассмотрим лишь несколько примеров того, как знание механизмов регуляции ферментативной активности в живых клетках, а также условий и закономерностей протекания биохимических реакций используется (или может использоваться) в биотехнологической практике.

## 6.2. ПРИМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

### 6.2.1. ПОВЫШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Понимание биохимических механизмов биотехнологических процессов позволило осуществлять эффективное управление протекающими в них реакциями с целью повышения выхода полезных продуктов. Во многих случаях управление основано либо на непосредственном воздействии на биологические катализаторы-ферменты, либо на создании благоприятных условий для функционирования микроорганизмов-продуцентов.

Получение и использование ферментов составляет основу многих биотехнологических процессов, и именно свойства ферментов определяют, при каких температурах, рН, ионном составе и других физико-химических условиях надо вести тот или иной процесс для достижения максимальных результатов с минимальными затратами.

Невысокая стабильность белковых макромолекул ограничивает область их практического применения, что делает актуальной стабилизацию ферментов.

Существует несколько основных подходов к повышению стабильности ферментов:

- использование стабилизирующих добавок;
- химическая модификация структуры макромолекулы;
- иммобилизация на твердых носителях;
- изменение первичной структуры фермента методами белковой инженерии.

В последнее время все большее распространение получает применение в биотехнологических процессах ферментов микроорганизмов-экстремофилов. Такие ферменты устойчивы в неблагоприятных физико-химических условиях и не требуют специальной стабилизации.

Применение *стабилизирующих добавок* благоприятно сказывается на сроках хранения ферментных препаратов, однако добавки не оказывают значительного влияния на операционную стабильность белков. В качестве стабилизирующих могут

вводятся такие добавки, как специфические лиганды, соли, хелатирующие и редуцирующие вещества, полимеры, полиолы, сахара, метиламины, аминокислоты, ПАВ и др.

Одной из наиболее интересных групп стабилизаторов являются так называемые химические шапероны – вещества, способствующие сохранению структуры молекул ферментов (и, соответственно, их функций) в неблагоприятных условиях. Молекулы этих соединений обладают шапероноподобной активностью, стабилизируя нативную (естественную) конформацию белков и защищая их от различных видов экстремальных воздействий. Большинство из этих соединений не обладает белковой специфичностью и по своей природе относится к сахарам, многоатомным спиртам, аминокислотам, метиламинам, ПАВам. Примеры – трегалоза, глицерин, полиэтиленгликоль, аминокислоты, глицинбетаин, эктоин, хлорид бензалкония, додецилсульфат натрия, алкилоксибензолы.

*Химическая модификация* белковой молекулы – наиболее известный способ стабилизации ферментов. Увеличение стабильности достигается с помощью введения гидрофильных групп в поверхность молекулы фермента, что позволяет уменьшить контакт гидрофобных областей с водой, и тем самым предотвратить неправильный рефолдинг после обратимой денатурации.

Механизмы химической стабилизации белков могут быть разделены на следующие категории:

- поперечное связывание аминокислотных цепей бифункциональными реагентами;
- усиление гидрофобных взаимодействий неполярными реагентами;
- введение новых полярных или заряженных групп, приводящих к увеличению количества ионных или водородных связей;
- гидрофилизация поверхности белка с целью снижения нежелательных поверхностных гидрофобных контактов с водой;
- связывание белка с полисахаридами и полиэтиленгликолем.

*Иммобилизация* – традиционный метод стабилизации, успешно применяемый в химии белка и биотехнологии. Данный подход направлен на фиксацию каталитически активной конформации всей белковой глобулы за счет ограничения ее подвижности вследствие контактов с матрицей.

Матрица должна обладать высокой химической и биологической стабильностью, большой удельной поверхностью, доступной для фермента.

Для матрицы, как правило, используют органические полимеры природного или искусственного происхождения. В качестве природных матриц наибольшее распространение получили полисахаридные (целлюлоза, декстран, агароза) и белковые (кератин, коллаген, миозин) компоненты, тогда как синтетическими матрицами обычно являются полиамидные (полиакриламид) соединения.

Иммобилизация широко применяется для увеличения операционной и функциональной стабильности биокатализаторов. Понятия «операционная стабильность» и «функциональная стабильность» несколько различаются. *Операционная стабильность* характеризует способность фермента осуществлять каталитическую функцию в неблагоприятных условиях катализа. *Функциональная стабильность* отражает сохранение ферментом в неблагоприятных (вплоть до денатурирующих) условиях сохранять функциональную активность (проверяемую в оптимальных условиях). Данный метод позволяет легко контролировать скорость катализируемой реакции и выход продукта, кроме того, ферментативный процесс можно проводить непрерывно. Связывание с нерастворимой матрицей позволяет достаточно просто восстанавливать катализатор без его загрязнения и получать чистый продукт реакции. Изменяя свойства матрицы, можно регулировать специфичность и активность связанного фермента.

Иммобилизация биокатализатора на матрице может достигаться как путем ковалентного связывания компонентов, так и через сорбционные связи, различающиеся силой. В последнем случае присоединенная молекула биокатализатора сохраняет большую степень мобильности, так что активность фермента при определенных обстоятельствах может быть даже выше, чем при ковалентном связывании биокатализатора с матрицей.

Термостабильность при иммобилизации — это результат молекулярной жесткости и создания защитного микроокружения вокруг молекулы белка. Среди методов иммобилизации наиболее эффективными в аспекте термостабилизации являются многоточечное ковалентное прикрепление к матрице и включение ферментов в гель.

В ряде случаев оказывается более удобным иммобилизовать не отдельные ферменты, а целые клетки микроорганизмов, создавая условия, благоприятные для функционирования конкретного метаболического пути. Такие препараты могут длительное время функционировать в производственных процессах (например, при биосинтезе стероидных гормонов).

Методы *белковой инженерии* позволяют успешно модифицировать первичную структуру ферментов для улучшения их технологических свойств. К ним относятся: направленные изменения первичной последовательности (замены аминокислот) в активном центре фермента; продление полипептидной цепи; создание химерных белков, т.е. состоящих из частей разных природных белков. Например, включение пролина или образование дисульфидных мостиков повышают стабильность макромолекулы.

## 6.2.2. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-СВЕРХПРОДУЦЕНТОВ.

### ИЗМЕНЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ И БИОСИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Биосинтез аминокислот, широко используемых в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, является важной отраслью биотехнологии. Однако метаболизм аминокислот тонко регулируется на уровнях транскрипции, трансляции и активности ферментов, поэтому, чтобы получить их «избыточные» для клетки количества, необходимо нарушить или обойти регуляторные механизмы клетки. Так, ключевой фермент синтеза лизина ( $\beta$ -аспартаткиназа) аллостерически ингибируется лизином и треонином (продуктом дальнейших превращений лизина). Синтез этого фермента репрессируется L-метионином, также являющимся продуктом (интермедиатом) рассматриваемого метаболического цикла. При использовании мутантов *Corynebacterium glutamicum*, не способных к синтезу гомосерина (предшественника L-метионина), или треонина и метионина, снижаются внутриклеточные концентрации этих аминокислот, ослабляется ингибирование аспартаткиназы и происходит накопление лизина до 30 г/л. Отбор мутантов *C. glutamicum*, дефектных

по регуляции аспараткиназы, у которых она нечувствительна к повышению концентрации ингибиторов, позволяет накапливать до 35 г/л лизина.

Другой пример целенаправленного изменения метаболизма с целью заставить клетку производить избыточное для нее количество аминокислоты – сверхсинтез L-глутаминовой кислоты *C. glutamicum*. При лимитировании этой культуры по такому необходимому для нее фактору роста, как биотин, происходит изменение в метаболизме липидов и в свойствах мембраны, возрастает активность транспорта (выброс из клетки) этой аминокислоты, что снимает как ретроингибирование ее биосинтеза, так и репрессию синтеза ферментов.

### 6.2.3. СИНТЕЗ ПРАКТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ДИССОЦИАНТАМИ БАКТЕРИЙ

Диссоциация, внося важнейший вклад в создание гетерогенности популяции бактерий, приводит к нестабильности синтеза целевых продуктов в биотехнологических процессах. Биологическая активность диссоциантов может отличаться в 1,5–3 раза. М-клетки, обладающие среди диссоциантов минимальной толщиной клеточной стенки, синтезируют наибольшее количество веществ, выделяемых в среду: протеаз (*Bacillus mesentericus*, *Rhodococcus rubropertinctus*), экзополисахаридов (*R. rubropertinctus*, *Mycobacterium lacticolum*), липаз (*M. phlei*), нейромедиаторных аминов (*Bacillus subtilis*). S-клетки наиболее активны при трансформации стероидов (*Rhodococcus sp.*), синтезе витамина B<sub>2</sub> (*Rhodococcus rubropertinctus*), антибиотика низина (*Streptococcus lactis*), молочной кислоты (*S. lactis*), получении сорбозы из сорбита (*Gluconobacter oxydans*). R-клетки, которые обладают максимальной толщиной клеточной стенки, доминируют в популяциях бактерий, разрушающих токсические вещества: пиридин (*Rhodococcus aquosus*), малеиновую кислоту (*Alcaligenes xylosoxidans*), ПАВ (*Pseudomonas aeruginosa*).

Диссоцианты промышленных продуцентов могут различаться не только количеством, но и качеством синтезируемых практически ценных веществ. Антибиотик грамицидин S образуют примерно в равных количествах клетки R- и M-диссоциантов *Bacillus brevis*, S-диссоциант синтезирует два других антибиотика – эсеин и бресейн – и не образует грамицидин S. У про-

дущента инсектицида *B.thuringiensis* активными являются лишь R-клетки. Вирулентный для грызунов бактороденцид синтезирует только S-диссоциант *Salmonella enteritidis*. Диссоцианты производственных штаммов *Bacillus subtilis* образуют различные гидролитические ферменты: R – амилазу и металлопротеазу, S – амилазу, металлопротеазу и сериновую протеазу, M – сериновую протеазу. У клубеньковых бактерий азот фиксируют лишь M-клетки. Диссоцианты *Pseudomonas stutzeri* синтезируют различные цитокинины. В автотрофных условиях на водороде растут только R-клетки *Alcaligenes eutrophus*.

Исходя из приведенных примеров необходимо, пользуясь знанием закономерностей регуляции диссоциативных переходов, добиваться преобладания нужного диссоцианта, а при его утере – быстро восстанавливать его численность. Для этого можно использовать обработку культур химическими аналогами факторов  $d_1$ , индуцирующими образование покоящихся форм, при прорастании которых образуются популяции с расширенным спектром диссоциантов, что облегчает задачу выделения и размножения нужного варианта.

#### 6.2.4 Автолиз

*Автолиз* – это саморастворение клеток под действием собственных ферментов. Это необратимый процесс, приводящий к гибели клеток. Он происходит вследствие нарушения равновесия в клетках между процессами синтеза и гидролиза полимеров, прежде всего – клеточных оболочек (цитоплазматической мембраны и клеточной стенки). Таким образом, основной причиной автолиза является изменение активностей ферментов с противоположно направленным действием – гидролаз и синтеза.

Автолиз – естественная стадия в развитии микробных культур, и потому тонко регулируется. Автолиз также чрезвычайно важен в биотехнологии – он является необходимой стадией получения пищевого и кормового белка, а также продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, которые должны быть высвобождены из клеток в среду для их последующего выделения – ферментов, антибиотиков, нуклеотидов и др. Поэтому закономерности протекания и регуляции автолиза хорошо исследованы и применяются в биотехнологии.

Согласно постулату М.Дж. Вэлча, автолиз вызывается снижением энергообеспеченности клетки. В соответствии с этим, нарушая энергетический баланс клетки, можно вызвать ее автолиз. Последний индуцируют физическими (температура, облучение, осмотическое давление), химическими (рН, концентрация  $O_2$ , источники углерода, мембранотропные соединения) и биологическими (ферменты, антибиотики, аутоиндукторы автолиза) факторами. При воздействии этих индукторов нарушаются структура мембраны, энергетический метаболизм клеток, биосинтетические процессы, активность гидролазов. Гидролазы, осуществляющие автолиз, называют *автолизинами*. К ним относятся гликозидазы, амидазы и эндопептидазы, разрушающие пептидогликан клеточных стенок бактерий; хитиназы, манназы, глюканазы, пептидазы и амидазы, разрушающие клеточные стенки грибов и дрожжей, а также фосфолипазы, липазы, протеазы, нуклеазы.

### 6.2.5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК В БИОТЕХНОЛОГИИ

Важно отметить, что наряду с совершенствованием молекулярно-биологических подходов биотехнологи стали уделять больше внимания изучению сообществ микроорганизмов, формирующихся в биотехнологических процессах. В природных условиях подавляющее большинство микроорганизмов существует в виде структурированных ассоциаций, обозначаемых общим термином «биопленки» (см. разд. 5.2.). Аналогичные ассоциации создаются во многих биотехнологических процессах: при биоремедиации почв, микробном выщелачивании металлов из руд в процессе очистки сточной воды и во многих других случаях. Существуют специальные приемы, усиливающие формирование таких микробных ассоциаций. Эти приемы применяются в технологически важных процессах для повышения их эффективности, поскольку микроорганизмы, входящие в состав биопленок, характеризуются высокой устойчивостью к биоцидам и антибактериальным препаратам, а также к другим экстремальным воздействиям среды.

Взаимодействию микробных компонентов, входящих в состав биопленок, посвящено значительное количество исследований, однако до последнего времени основное внимание

в них уделялось микроорганизмам, принимающим непосредственное участие в процессе удаления токсичного компонента. Так, например, при очистке воды или почвы от нефтяных загрязнений используют микробные препараты, включающие несколько микроорганизмов-нефтеоокислителей с разной специфичностью воздействия на компоненты нефти, как, например, в препаратах «экосорб» и «деворойл». Такой подход оказался весьма перспективным, но при этом не учитывается влияние на процесс других микробных компонентов, которые всегда присутствуют в биопленках *in situ*. Эти микроорганизмы-спутники сами по себе часто неспособны осуществлять разложение загрязнений, но могут активировать жизнедеятельность микроорганизмов-деструкторов. Между компонентами биопленок устанавливаются трофические и регуляторные связи вплоть до симбиоза, при которых образование или потребление какого-либо субстрата в биопленке происходит с большей интенсивностью, чем в отсутствие микроорганизмов-спутников.

Использование биопленок в биотехнологических процессах в последнее время получает все большее распространение, особенно в связи с применением подхода, который можно назвать «биопленка – биореактор». В такой биопленке помимо микроорганизма (или микроорганизмов), осуществляющих основной, целевой для человека процесс, присутствуют специально введенные в нее организмы, повышающие их устойчивость и/или производительность микроорганизмов-деструкторов. В итоге введение дополнительных микробных компонентов, активирующих или защищающих основные микроорганизмы, формирующие такие биореакторы, может существенно повышать эффективность всего биотехнологического процесса.

Проиллюстрируем это положение следующим примером, когда дополнительный биокомпонент вводится в биопленку на основании исследования состава и взаимодействия микроорганизмов данного сообщества. В настоящее время нефть и продукты ее переработки являются одними из главных загрязнителей как почвы и пресноводных водоемов, так и вод мирового океана. При изучении деградации нефти нефтеоокисляющими микроорганизмами удалось показать, что в реконструированных биопленках, содержащих нефтеоокисляющие микроорганизмы и их естественные спутники, неспособные к окислению

нефтепродуктов, процесс окисления углеводов протекает со скоростями, многократно превышающими скорости окисления этих субстратов в отсутствие спутников. Это обусловлено выделением спутниками в среду веществ, активирующих жизнедеятельность нефтеокислителей.

Роль спутников в биопленках может также заключаться в предохранении микроорганизма-деструктора от стрессового воздействия окружающей среды. Например, галофильный спутник в составе биопленки может предохранять негалофильный нефтеокислитель от гиперосмотического шока за счет образования осмопротекторных веществ.

Таким образом, представленные примеры иллюстрируют эффективность и целесообразность применения нового подхода к организации биотехнологических процессов – использованию в них биопленок контролируемого состава, что позволит увеличить производительность систем в целом без значительных дополнительных затрат. В использовании такого подхода важными и одинаково необходимыми являются как формирование собственно биопленки, так и регулирование состава ее сообщества (биоаугментация).

# ЛИТЕРАТУРА

## ОСНОВНАЯ

1. *Алейникова Т.Л.* и др.; под ред. Е.С.Северина. Биохимия: учебник для вузов / Т.Л. Алейникова, Л.В. Авдеева, Л.Е. Андрианова – 5-е изд. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2008. – 759 с.
2. *Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. – 3-е изд., 2001. – 300 с. (<http://www.medliter.ru/?page=get&id=010512>).
3. *Кольман Я., Рём Л.-Г.* Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000.
4. *Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия: учебник для вузов. – 3-е изд. – М.: Дрофа, 2008. – 639 с.
5. *Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л.* Молекулярная биология. – М.: МИА, 2003.
6. *Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989.
7. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 1 и 2 / под ред. Й. Ленгеллера, Г. Дрекса и Г.Шлегеля. – М.: Мир, 2005.
8. *Шлегель Г.* Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
9. *Албертс Б.* и др. Молекулярная биология клетки: в 3 т. – М.: Мир, 1994.
10. *Пиневиц А.В.* Микробиология. Биология прокариотов: в 3 т. – СПб.: Изд.-во СПбУ, 2009.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

11. *Березин И.В.* и др. Иммуобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашев. – М.: Высшая школа, 1987. – 160 с.
12. Биотехнология. Принципы и применение / И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
13. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
14. *Деткова Е.Н., Пушева М.А.* Энергетический метаболизм галофильных и алкалофильных ацетогенных бактерий // Микробиология. 2006. – Т. 75. – С. 5–17.
15. *Кузмина Н.А.* Основы биотехнологии. [http://www.biotechnolog.ru/about\\_book.htm](http://www.biotechnolog.ru/about_book.htm)
16. *Николаев Ю.А., Плакунов В.К.* Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. – Т. 76. – № 2. С. 149–163.

17. *Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.* Редокс-регуляция клеточных функций // *Биохимия*. 2007. — Т. 72. — Вып. 2. — С. 158–174.
18. *Плакунов В.К., Николаев Ю.А.* Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // *Вода: химия и экология*. 2008. — № 2. — С. 11–13.
19. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. — М.: Наука, 1985.
20. *Шелемех О.В., Плакунов В.К.* Кислородная регуляция метаболизма микроорганизмов // *Микробиология*. 2009. — Т. 78. — № 5.
21. *Beer D. de, Stoodley P.* Microbial biofilms // *Prokaryotes, Third Edition* (Editor-in-Chief M. Dworkin). 2006. — V.1. — P. 904–937.
22. *Dimroth P.* Bacterial energy transduction coupled to sodium ions // *Res. Microbiol.* 1990. — V. 141. — P. 332–336.
23. *Drake H.L., Kusel K., Matthies C.* Acetogenic prokaryotes. // *Prokaryotes*. Editor-in-Chief M. Dworkin. 2006. — V.2. — P. 354–420.
24. *Garrett R.H., Grisham C.M.* Biochemistry. 2-ed. 2003. <http://www.web.virginia.edu/Heidi/home.htm>
25. *Rouviere P.E., Wolfe R.S.* // *J. Biol. Chem.* et al. — 1988. — V. 263. — P. 7913–7916.
26. *Fuerst J.A., Webb R.I., van Niftrik L.* et al. Anammoxysomes of anaerobic ammonium-oxidizing planctomycetes (Complex intracellular structures in prokaryotes); Ed. J.M.Shively. — Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.
27. *Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В.* Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // *Микробиология*. — 2010. Т. 79. — № 4.
28. *Toro E., Shapiro L.* Bacterial chromosome organization and segregation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. — № 2.
29. *Harwood C. R., Cranenburgh R.* Bacillus protein secretion: an unfolding story // Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tim.2007.12.001. Available online 7 January 2008.
30. *Piłsyk S., Paszewski A.* Sulfate permeases — phylogenetic diversity of sulfate transport // *Acta Biochimica Polonica*. 2009. — V. 56. — P. 375–384.
31. *Jonas K., Melefors O., Romling U.* Regulation of c-di-GMP in biofilms // *Future Microbiol.* 2009. — V. 4. — P. 341–358/

Учебное издание

**В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев**

## **ОСНОВЫ ДИНАМИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ**

Учебник

Редактор *Е.В. Комарова*  
Корректор *Н.С. Седова*  
Компьютерная верстка *А.М. Моисеева*  
Оформление

Подписано в печать 22.02.10. Формат 84x108/32  
Печать офсетная. Бумага офсетная. Печ. л. 13,5  
Тираж экз. Заказ

Издательская группа «Логос»  
123104, Москва, Б.Палашевский пер., д. 9, стр. 1

**ПО ВОПРОСАМ ПРИОБРЕТЕНИЯ ЛИТЕРАТУРЫ ОБРАЩАТЬСЯ:**

**Издательская группа «Логос»**

111024, Москва, ул. Авиамоторная, д. 55, корп. 31

**Справки по тел.:** (495) 221-50-16, 644-38-04

**Электронная почта:** [universitas@mail.ru](mailto:universitas@mail.ru)

Дополнительная информация на сайте [www.logosbook.ru](http://www.logosbook.ru)