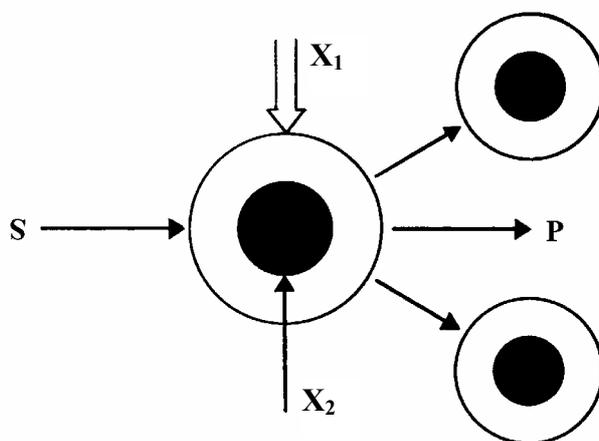


Ю.П.Фролов, М.М.Серых

УПРАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

КЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ю.П.Фролов, М.М.Серых

**УПРАВЛЕНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИМИ
СИСТЕМАМИ**

КЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ

Под редакцией Ю.П.Фролова

Издательство "Самарский университет"
2000

ББК 28.071
УДК 574.6: 577.1: 577.3
Ф 911

Фролов Ю.П., Серых М.М. Управление биологическими системами. Клеточный уровень. Самара: Изд-во “Самарский университет”, 2000. 116с.

ISBN 5-230-06193-6

Книга является второй публикацией из серии, посвященной проблеме искусственного управления биологическими системами. Рассмотрены вопросы управления различными функциями клетки с помощью физических, химических и биологических воздействий.

Предназначена для аспирантов, преподавателей и практических работников, чьи интересы соприкасаются с рассмотренными в книге вопросами. Она может быть также использована как учебное пособие по вузовским дисциплинам “Биологическая кибернетика”, “Введение в биотехнологию” и как самостоятельное учебное пособие по спецдисциплине “Управление биологическими системами”.

Рецензенты: д-р биол. наук В.Г.Подковкин
(Самарский медицинский университет),
канд. биол. наук, проф. В.М.Астафьев
(Самарский педагогический университет)

Ф $\frac{1901000000 - 016}{6К(03) - 2000}$ 10 – 2000

ISBN 5-230-06193-6

© Фролов Ю.П.,
Серых М.М., 2000

**Фролов Юрий Павлович
Серых Милон Матвеевич**

**УПРАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИМИ
СИСТЕМАМИ**

КЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ

Редактор Н.А.Волынкина
Компьютерный набор И.М.Лавринова
Компьютерная верстка И.М.Лавринова, Л.Л.Паймулина

Л.Р.№ 020316 от 04.12.96. Подписано в печать 19.02.99. Формат 60x84/16
Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 6,74 усл. печ. л.; 7,25 уч.-изд. л.
Тираж 500 экз. Гарнитура «Arial». С.16. Заказ №
Издательство «Самарский университет», 443011, г.Самара, ул.Акад. Павлова,1.
ОАО ПО «СамВен», 443099, Самара, ул.Венцека,60.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Из всех биологических систем наиболее изученными оказались ферменты как простейшие, способные к автономному функционированию объекты. Для них построены математические модели, которые позволяют выявить различные способы управления скоростью ферментативной реакции и оценить эффективность воздействия каждого из них.

Клетка представляет собой надсистему, включающую большое количество субклеточных структур, каждая из которых состоит из множества функционально связанных молекулярных подсистем. Все эти биологические подсистемы, системы и надсистемы имеют свои иерархически организованные системы управления. Сложность осуществления целенаправленного воздействия на клетку обусловлена не только необходимостью учитывать бесчисленное количество внутриклеточных связей, но и неполной изученностью внутриклеточных процессов. Указанные обстоятельства не позволяют создать не только полную математическую модель клетки, но и предшествующую ей концептуальную модель. Кроме того, в действительности предстоит построить не одну обособленную модель клетки, а целый набор моделей, так как только у позвоночных четко различают более 200 типов специализированных клеток. Помимо них, необходимо учесть большое число типов клеток у беспозвоночных животных и растений, а также великое множество видов одноклеточных организмов.

Клетки относятся к числу многосвязных объектов управления. Для них по сравнению с ферментами существует значительно большее число управляемых величин, среди которых в зависимости от специализации клетки на передний план выступают разные параметры.

В книге рассмотрены способы управления работой клеток и одноклеточных организмов на фенотипическом (через параметры внешней среды) и генотипическом (путем воздействия на структуру генома) уровнях.

С учетом всего сказанного в настоящее время представляется возможным рассмотреть лишь общие подходы к искусственному управлению клеткой, что авторы и постарались сделать в небольшой по объему книге.

Все главы книги написаны Ю.П.Фроловым, за исключением параграфов 4 и 6 первой главы, подготовленных совместно с профессо-

ром М.М.Серых, который любезно согласился принять участие в работе над книгой.

Авторы считают своим долгом выразить признательность профессору Московского госуниверситета С.А.Чепурнову, сделавшему ряд полезных замечаний по рукописи книги, а также И.М. Лавриновой за компьютерный набор книги.

Разумеется, книга не лишена недостатков, поэтому все замечания и предложения будут с благодарностью приняты авторами по адресу: г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1, госуниверситет, биофак.

Июль, 1999 г.

ГЛАВА ПЕРВАЯ

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ УПРАВЛЕНИЯ КЛЕТКОЙ

§1. Клетка как объект управления

К биологическим объектам, которые можно назвать клетками, относятся одноклеточные организмы и клетки многоклеточных организмов. Одноклеточные организмы часто различаются между собой в меньшей мере, чем различные типы клеток одного организма. Все одноклеточные организмы содержат ядро (у прокариот - упрощенного строения); среди клеток многоклеточных организмов наряду с ядерными клетками существуют безъядерные (эритроциты млекопитающих).

Колоссальное многообразие конкретных проявлений клеточной организации живого, тем не менее, позволяет выделить их общие свойства и составить определенное суждение об "усредненной" клетке. Последняя, как правило, представляет собой отграниченный от окружающей среды микроскопический объем функционально активной биомассы, содержащей ядро или его аналог (нуклеоид) и цитоплазму. В этом объеме протекают сотни разных биохимических реакций, подавляющая часть которых катализируется ферментами. Несмотря на высокую специфичность последних, без компартиментализации клеточного объема, в максимальной мере выраженной у эукариот, упорядоченное протекание сложнейшей сети биохимических реакций было бы невозможно. Компартиментализация позволяет локализовать специализированные на выполнение определенных функций ферменты и субстраты в сравнительно небольшом объеме, создать в нем достаточно высокую концентрацию участников реакций и обеспечить оптимальную среду для их протекания. Полезным дополнением компартиментализации является иммобилизация многих ферментов на клеточных мембранах. Однако все это создает лишь качественную основу для упорядоченной последовательности биохимических реакций. Без соответствующей системы управления и регулирования клетка не смогла бы просуществовать даже самое непродолжительное время. Эта система обеспечивает согласованное протекание внутриклеточных процессов при оптимальных условиях. Она "прошивает" бесчисленным количеством обратных связей всю сеть внутриклеточных биохимических реакций, подчиняет своему влиянию каждую молекулу в клеточном объеме. Этому, прежде всего, способствует замечательная приспособленность ферментов к восприятию управляющих воздействий и адекватному реагированию

на них. Ферменты, как исполнительные элементы клетки, обладают исключительной “исполнительской дисциплиной”.

Существенной особенностью клетки, отличающей ее от молекулярных биосистем, является способность к самовоспроизведению. Первичным источником информации при построении клетки являются ее молекулы ДНК. Велика роль в этом процессе структурной информации макромолекул и субклеточных структур, которая является вторичной и детерминирована молекулами ДНК. Она позволяет в период между делениями клетки с участием механизма самосборки удваивать число внутриклеточных структур, а также осуществлять их репарацию.

Под понятие “усредненной” клетки в большей степени подходят малодифференцированные клетки многоклеточных организмов и клетки, культивируемые *in vitro*.

Клетка, даже наиболее просто устроенная - прокариотическая, в отношении управляемости безусловно относится к числу кибернетических систем. В ней морфологически и функционально четко выделяются три потока (энергии, материи, информации), необходимые для осуществления процессов жизнедеятельности. Эти потоки организуются и приводятся в действие своими наборами макромолекул и своими надмолекулярными структурами. В то же время все три потока взаимозависимы, и для нормального функционирования клетки необходима согласованная работа их. Поэтому при анализе управляемости потоков отдельное рассмотрение их носит чисто условный характер.

Клетка в целом, а также ее органеллы, как правило, имеют все основные элементы кибернетической системы: управляющую и исполнительную структуры, объект управления, обратную связь между выходом и входом системы.

Иерархическая структура управления внутриклеточными процессами позволяет, опять же условно, рассматривать отдельно способы направленного искусственного воздействия на разные органеллы как специализированные на выполнение определенных функций системы.

§ 2. Практические задачи цитокибернетики

Условимся, по аналогии с существующими терминами “физиологическая кибернетика”, “нейрокибернетика” и др., отражающими от-

дельные направления в биологической кибернетике [1], называть ее раздел, посвященный вопросам управления на клеточном и субклеточном уровнях, клеточной кибернетикой, или цитокибернетикой. Наряду с теоретическими проблемами, связанными с изучением строения и функционирования клеточных систем управления, цитокибернетика призвана решать важные практические вопросы искусственного воздействия на клетки с целью получения полезного результата оптимальным путем. В этом плане главными являются медицинский и производственный аспекты использования достижений цитокибернетики, которые решаются преимущественно биотехнологией в рамках таких ее разделов, как промышленная микробиология, клеточная и генетическая инженерия. Объектами промышленной микробиологии являются, как правило, одноклеточные микроорганизмы. Клеточная инженерия занимается культивированием клеток многоклеточных организмов, а генетическая инженерия - вопросами получения и тиражирования рекомбинантных ДНК, пригодных для последующей транскрипции РНК. Реализация достижений названных разделов биотехнологии позволяет получать в больших количествах биомассу и выделяемые клетками метаболиты, очищать окружающую среду от вредных веществ, извлекать из руд металлы, решать энергетические проблемы общества и т.д.

Клетками и их органеллами, как прочими кибернетическими системами, можно управлять двояко: с помощью внешних воздействий и посредством изменения внутренней структуры самой системы. В первом случае задачей управления является поиск таких значений воздействий, которые обеспечивают оптимальный результат (максимальную производительность системы, минимальную стоимость единицы продукции и др.). Второй путь управления клеткой связан, прежде всего, с изменением ее генетической структуры. Первоначально люди использовали для этой цели стратегию биологической эволюции, оставив в неприкосновенности изменчивость и наследственность и заменив естественный отбор на искусственный. Затем вместо естественной изменчивости они стали применять более эффективный, искусственный, мутагенез (химический, физический), который по-прежнему не обладал направленным действием. Генетическая инженерия позволяет производить направленные воздействия на наследственный аппарат клетки. В частности, сайт-специфический мутагенез позволяет получать молекулу белка, отличающуюся от белка-прототипа заменой лишь одного аминокислотного остатка в строго заданном положении. Стали возможными и более существенные изменения в строении ДНК: создание генов эукариот,

лишенных интронов, перенос их в геном прокариот, обеспечение экспрессии этих генов. Такой перенос генетической информации принципиально отличается от имеющего место при половой гибридизации организмов и других вариантах естественного обмена генетической информацией между клетками. Более того, сделаны определенные шаги в химическом синтезе генов, способных кодировать не встречающиеся в природе белки.

Управляемыми признаками клетки могут быть плоидность (кратное увеличение числа наборов хромосом), амплификация отдельных генов (увеличение числа копий отдельных генов в хромосоме), активность систем репарации ДНК, скорость роста и время генерации клетки (интервал времени между двумя последовательными делениями клетки), включая полную остановку процесса деления клетки.

Особо важными процессами, ждущими теоретически обоснованных методов направленного воздействия, являются дифференциация и редифференциация клеток. Управление дифференциальной активностью генов имеет много чрезвычайно важных практических выходов, оно связано, в частности, с широко обсуждаемой в настоящее время проблемой клонирования человека и животных. В принципе, возможно создание помимо имеющихся типов клеток новых, с иным набором экспрессированных генов. В этом случае речь могла бы идти о конструировании каких-то новых организмов.

§ 3. Структурная организация потоков вещества, энергии и информации в клетке

В отличие от молекулярных биологических систем, в клетке можно четко выделить все три структурно оформленных потока, присущих живым системам. Это - потоки вещества, энергии и информации.

Исходными субстратами потока вещества у автотрофных организмов являются химические молекулы неорганической природы, у гетеротрофных организмов - обычные полимерные органические соединения, которые перед поступлением в клетку во многих случаях подвергаются ферментативному расщеплению на универсальные "строительные блоки" (аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты и др.). Поток вещества обеспечивает клетку материалом, из которого с участием энергии и информации происходит самовоспроизведение клетки и репарация ее структур, получивших повреждения. Кроме того, поток вещества осуществляет материальное наполнение остальных двух потоков. Поступление одних веществ в клетку и выход

из нее других осуществляется и контролируется преимущественно плазмалеммой. Молекулы малых размеров чаще всего проходят через клеточную мембрану "поштучно" путем пассивной диффузии, облегченной диффузии и активного транспорта. Растворы крупных молекул, микроорганизмы и другие частицы могут поступать внутрь клетки посредством эндоцитоза с его разновидностями: пиноцитозом и фагоцитозом. Сходный механизм осуществляет выведение молекул из клеток (экзоцитоз), а также перенос новосинтезированных макромолекул в различные компартменты клетки. Этот внутриклеточный транспорт веществ осуществляется посредством пузырьков, в формировании которых и адресной доставке к соответствующим компартментам непосредственное участие принимает аппарат Гольджи. В нем же, в частности, формируются первичные лизосомы. Для эукариотических клеток и одноклеточных организмов характерно внутриклеточное пищеварение, осуществляющее деградацию макромолекул, микроорганизмов и других частиц с помощью вторичных лизосом или специальных пищеварительных вакуолей. Поступающие внутрь клетки субстраты расходуются на построение внутриклеточных структур (биомассы) и веществ, выделяемых за пределы клетки (антибиотиков, экзоферментов и др.).

Конечными продуктами энергетического потока обычно являются молекулы, содержащие макроэргические связи (АТФ и др.), а также мембранные электрохимические потенциалы. Их образование происходит за счет аэробного и анаэробного окисления субстратов или с помощью фотосинтеза. Характерными структурами энергетических потоков являются митохондрии, хлоропласты, а также ансамбли растворимых ферментов.

Основной внутриклеточный поток информации зарождается в ядре и имеет генетическую природу. Здесь не только находится первоисточник генетической информации, но и происходит редупликация ДНК, а также избирательная транскрипция отдельных ее участков, в результате чего резко возрастает мощность потока информации, поступающей в цитоплазму. В ядре с участием ряда ферментов осуществляется репарация поврежденных участков ДНК. Здесь же в ядрышке происходит формирование рибосом, транслирующих в цитоплазме информацию, записанную на мРНК, в аминокислотную последовательность полипептидов. Небольшой ручеек генетической информации образован молекулами ДНК митохондрий и пластид, которые также редуплицируются и транскрибируются. Затем с участием рибосом митохондрий и пластид эта информация используется для синтеза белков.

Информационный поток вовлекает в свое русло потоки вещества и энергии, “оживотворяет” их, формирует из этих неживых субстанций живые биологические системы. Он воссоздает себя, умножает количество живой материи и организует в течение длительного времени слаженную работу созданных им систем. Важная роль при этом отводится взаимоотношениям типа узнавания, существующим между участниками биологических, в частности, внутриклеточных процессов. Под узнаванием академик В.А. Энгельгард понимал “специфически направленное и пространственно организованное установление контактов молекул биополимеров между собой (а также с более низкомолекулярными биологически активными соединениями или с метаболитами, т.е. с промежуточными продуктами обмена веществ). Эти контакты устанавливаются под действием тех же слабых сил межмолекулярного взаимодействия, которые ответственны за явления интеграции; поэтому обе эти области в значительной степени взаимно перекрываются” [2]. Ведущее значение имеет узнавание в процессах самосборки надмолекулярных структур. Однако вряд ли только механизм самосборки можно объяснить формирование клетки, а узнаванием комплементарных молекул - слаженную работу ее структур. По-видимому, кодированием аминокислотной последовательности полипептидов далеко не исчерпывается функция молекул ДНК, и “избыточное” содержание в их составе не кодирующих белки нуклеотидов объясняется иной ролью последних в работе клетки.

Характерной особенностью конформации наиболее важных, функционально активных биомолекул - белков и нуклеиновых кислот - является преобладание спиральной укладки полипептидных и полинуклеотидных цепей. Это относится к молекулам ДНК, имеющим самый представительный набор степеней спирализации. Многократная спирализация позволяет на несколько порядков сократить линейный размер метафазной хромосомы по отношению к исходной длине молекулы ДНК. Однако такая компактизация хроматина создает серьезные затруднения для осуществления репликации и транскрипции. В то же время молекулы полинуклеотидов (с участием белков) могли бы образовывать “макrame” практически любой конфигурации, в том числе складчатой (зигзагообразной), обеспечивающей не меньшую степень компактизации, чем спиральные структуры, и высокую доступность любого участка ДНК для репликации, репарации и транскрипции. Принципиального запрета на такую укладку ДНК, равно как и на многие другие, нет, однако эволюция выбрала спиральную, несмотря на большие неудобства, которые возникают при

осуществлении этими молекулами своих функций. Причиной такого выбора могло быть появление какой-то важной дополнительной функции у молекул, принимающих спиральную конформацию. Не исключено, что такой функцией является неконтактное межмолекулярное и межклеточное взаимодействие электромагнитной природы, а спиральные молекулы обеспечивают его реализацию [3].

Подавляющее большинство внутриклеточных и внутриорганизменных процессов в настоящее время объясняют с позиции контактных (химических) взаимодействий, однако благодаря работам А.Г.Гурвича [4], А.Л.Чижевского [5], В.П.Казначеева [6], Цзяна Каньчжэна [7], П.П.Гаряева [8,9], Н.П.Лупичева [10], С.Э.Шноля [11], Э.Н.Чирковой [12] и других пробивает себе дорогу осознание важной роли в функционировании организмов дистанционных бесконтактных взаимодействий, происходящих с участием электромагнитных волн. Такого рода воздействия могут осуществляться как на большие расстояния (например, вспышки на Солнце), так и на малые (митогенетическое излучение). Они способны выполнять функции как энергетического обмена, так и канала передачи информации, в том числе управляющей.

Один из возможных механизмов, обеспечивающих бесконтактный обмен информацией между биосистемами, основан на признании за хроматином, прежде всего за его ДНК, способности генерировать электромагнитные колебания и улавливать их подобно колебательному контуру, включающему индуктивность и емкость. При рассмотрении спиралевидных структур ДНК обнаруживается принципиальное сходство их с элементами колебательного контура радиотехнических устройств. Молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных

цепей, удерживаемых на расстоянии приблизительно 11 \AA друг от друга водородными связями между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Полинуклеотидные цепи обвивают

друг друга, образуя двойную спираль (хеликс) с шагом 34 \AA и диа-

метром 20 \AA . На один виток хеликса приходится 10 пар нуклеотидов (п.н.), всего же двойная спираль содержит в среднем 10^8 п.н. Длина хеликса достигает 5 см и более. Эта спираль намотана на дисковидные "катушки", состоящие из белков (гистонов). Витки располагаются в бороздках по два на диске, который вместе с намотанным на него участком ДНК называется нуклеосомой. Диаметр нуклеосомы при-

близительнo 100 \AA (около 110 \AA), толщина диска около 60 \AA . Нуклеосомы соединяются между собой короткими неспирализованными участками ДНК (линкерами). При определенных условиях нуклеосомы сливаются друг с другом, образуя 100 \AA -фибриллу. Последняя, в свою очередь, закручивается в плотную спираль с шагом 100 \AA и диаметром 300 \AA . Такая упаковка называется соленоидной, а спираль 300 \AA -фибриллой. Следующий уровень компактизации - образование 300 \AA -фибриллой петель. Полагают, что петли крепятся к нуклеонемам (скелетным нитям ядра), которые также укладываются спирально, образуя соленоид диаметром около 2 мкм, соответствующим диаметру метафазной хромосомы. Это и есть высший уровень упаковки хроматина (ДНК и связанных с ней белковых молекул). Таким образом, цепи молекул ДНК образуют сложные структуры с возрастающей степенью спирализации, когда из соленоида низкого порядка формируется соленоид более высокого порядка. Такого рода структура характерна для неактивного, неработающего хроматина. При переходе хроматина в транскрипционное состояние и при репликации происходит деконденсация его - разрушение спиральных структур на тех участках, где осуществляются эти процессы [13]. Чтобы принимать участие в улавливании или генерировании электромагнитных волн, молекула ДНК, скрученная в сложную спираль, должна обладать способностью проводить электрический ток вдоль своих цепей. Есть основания полагать, что такой способностью она обладает. В нативных условиях все звенья цепей заряжены отрицательно вследствие диссоциации остатков фосфорной кислоты и окружены ионами натрия. Бороздки, в которых располагаются витки ДНК на дисках нуклеосом, образованы щелочными белками (гистонами), которые, вероятно, электрически изолируют "металлизированные" витки друг от друга. В этом случае спиральные структуры ДНК можно рассматривать как катушки индуктивности микроскопических колебательных контуров, а деспирализованные участки ДНК - как антенны, превращающие замкнутые колебательные контуры в открытые. Для грубой оценки порядка частот собственных колебаний таких молекулярных контуров воспользуемся известной форму-

лой, связывающей их параметры (коэффициент самоиндукции катушки - L и емкость конденсатора - C) с периодом колебаний T:

$$T = 2\pi\sqrt{LC} . \quad (1.1)$$

Для соленоида значение

$$L = 4\pi\mu n^2 V / 10^9 \text{ (генри)}, \quad (1.2)$$

где μ - магнитная проницаемость, n - число витков на единицу длины соленоида; V - объем соленоида [14].

Для хеликса с диаметром $20 \overset{0}{\text{Å}}$ и длиной $l = 5$ см, содержащего 10^8 п.н., с учетом того, что на один его виток приходится 10 п.н., а магнитная проницаемость воды $\mu \approx 1$:

$$L = 4 \cdot 3,14 \cdot 1 \cdot \left(\frac{10^8}{10}\right)^2 \cdot \frac{3,14 \cdot (20 \cdot 10^{-8})^2}{4 \cdot 10^9} \cdot 5 \approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ гн.}$$

Примем в первом приближении C равной емкости уединенной сферы с диаметром, соответствующим среднему размеру эукариотической клетки (≈ 20 мкм). В этом случае $C \approx 2 \cdot 10^{-15}$ фарады.

Собственный период колебаний хеликса, имеющего электрический контакт с плазмалеммой, из (1.1):

$$T = 2 \cdot 3,14 \cdot \sqrt{2 \cdot 10^{-7} \cdot 2 \cdot 10^{-15}} \approx 1,2 \cdot 10^{-11} \text{ с.}$$

Этому периоду колебаний соответствует частота порядка 100 Гц и длина волны (в расчете на воздушную среду) миллиметрового диапазона (≈ 3 мм). Однако здесь приходится иметь дело с несвойственной радиотехнике конфигурацией колебательного контура типа соленоида второго и более высоких порядков, образующего при протекании электрического тока закрученные в спираль магнитные потоки. Возможно, это способно привести к возникновению так называемых торсионных колебаний, обладающих, судя по отрывочным литературным данным, рядом особенностей, в том числе высокой проникающей способностью. Кроме того, на работу ДНК-контура в условиях клетки должны оказывать влияние ее слоистые структуры (мембраны), органоиды, жидкая среда сложного состава. Определенный эффект можно ожидать и от двухцепочечности ДНК, напоминающей двухпроводной фидер, а также от расположенных **параллельно** друг другу **плоских** молекул пуриновых и пиримидиновых оснований, напоминающих пластины конденсатора как элемента радиотехнического колебательного контура. Следует учитывать также полупроводни-

ковые свойства молекулы ДНК (и белков) и ее способность превращать механическую энергию теплового движения в электрическую [15]. В такой сложной системе возможно генерирование колебаний, их усиление, возникновение бегущей волны, улавливание электромагнитных колебаний из окружающей среды и т.п. Среди источников питания микроскопических “радиотехнических устройств” клетки можно назвать бегущие вдоль цепей ДНК дискретные электрические потенциалы, возникающие в процессе транскрипции и репликации. В этих условиях возможно появление одиночных волн (солитонов). С учетом сказанного можно ожидать, что частота электромагнитных колебаний может лежать как в области сверхвысокочастотного (СВЧ), так и крайне высокочастотного (КВЧ) диапазонов.

Альтернативный описанному выше механизм генерирования и улавливания электромагнитных колебаний молекулой ДНК основан на способности ее к механическим крутильным (торсионным) колебаниям, открытым отечественными (М.Д. Франк-Каменецкий с соавт.) и зарубежными учеными. Крутильные колебания двойной спирали ДНК обусловлены тепловым движением и имеют частоты порядка гигагерц. При этом происходит перемещение заряженных групп молекул ДНК в пространстве и, как следствие, генерирование электромагнитных колебаний. Так как частота и амплитуда колебаний зависят от конформации молекулы ДНК, изменяющейся при репликации и транскрипции, эти процессы, по-видимому, будут вызывать модулирование колебаний. Последние, как и в первой модели, могут улавливаться соответствующими участками одноименных молекул ДНК, а резонансные колебания этих участков - стимулировать экспрессию генов, например, путем разрыва водородных связей между комплементарными основаниями.

Суть третьей модели, предложенной П.П.Гаряевым с соавторами, “состоит в том, что геном высших организмов рассматривается как солитонный биологический компьютер, формирующий пространственно-временную структуру биосистем по волновому образупредшественнику. При этом в качестве носителей полевых генов выступают волновые фронты, задаваемые генограммами, и так называемые солитоны на ДНК - особый вид акустических и электромагнитных полей, продуцируемых генетическим аппаратом самого организма и способных к посредническим функциям по обмену стратегической регуляторной информацией между клетками, тканями и органами биосистемы. ... Что касается хорошо известных и детально изученных генов, кодирующих белки, то они занимают только около 1% от всей массы ДНК биосистем и выполняют свойственные им

чисто вещественные функции по реплицированию РНК и белков. Основная же часть знаковых структур хромосом расположена в оставшихся 99%, которые считались “мусорными”, т.е. якобы не выполняющими никаких генетических функций. Но именно эта большая часть хромосом анализируется в рамках ГБВ-модели (Гаряева-Березина-Васильева-модели - Ю.Фролов) как главная “интеллектуальная” структура всех клеток организма, включая головной мозг” (Гаряев с соавт., 1995).

Действительно, попытки распространить принципы самосборки на формирование внутриклеточных структур, клетки и многоклеточных систем, равно как и стремление объяснить цитодифференцировку качественно неравноценным распределением цитоплазмы при дроблении яйцеклетки, вряд ли можно назвать конструктивными. Всеми этими процессами управляет программа, написанная на неизвестном нам языке, отличным от того, на котором кодируется информация о первичной структуре белков. И главную роль в работе генома, по-видимому, играют волновые процессы, освоив которые, можно будет радикально решать множество проблем, прежде всего в медицине.

Следует иметь в виду, что волновые коммуникации обслуживают связи не только между молекулами нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Значительная доля во вторичной структуре белковых молекул приходится на участки, представленные α -спиралями и β -структурами. В частности, α -спираль геометрически тоже напоминает катушку индуктивности с параметрами, близкими таковым для ДНК. Действительно, один виток α -спирали образован 3,6 аминокислотными остатками, которым на ДНК соответствуют $3,6 \cdot 3 = 10,8$ оснований. Известно, что на один виток вторичной структуры ДНК (хеликса) в В-форме приходится 10 п.н., а в А-форме, которую, как считают, ДНК принимает при транскрипции (в “рабочем” состоянии), - 11 п.н. [16]. Таким образом, число витков α -спирали полипептида практически совпадает с числом витков спирали ДНК, на которой закодирована аминокислотная последовательность этой α -спирали. Диаметр спи-

рали ДНК, измеренный по атомам фосфора, равен $18 \overset{0}{\text{Å}}$; диаметр цилиндрической поверхности, на которой расположены все α -угле-

родные атомы полипептидной спирали, равен $10 \overset{0}{\text{Å}}$. В отличие от спирали ДНК, у которой пуриновые и пиримидиновые основания располагаются ближе к оси, у α -спирали радикалы аминокислот ориентированы наружу и ее реальный диаметр соизмерим с диаметром

спирали ДНК. Характерно, что и молекулы РНК образуют на некоторых участках короткие спиральные структуры (шпильки). Совпадение геометрических параметров спиральных структур ДНК и белков, образованных совершенно разными химическими “блоками” (остатками нуклеотидов и аминокислот), дает определенные основания предположить, что оно имеет неслучайный характер, а обусловлено наличием “радиотехнического” канала связи (возможно, двусторонней) между этими видами молекул. Описанные модели являются лишь попыткой объяснить механизм взаимодействия молекулярных структур на расстоянии в радиочастотном диапазоне колебаний, которое экспериментально подтверждено и находит практическое применение. В частности, нами были проведены исследования по неконтактному действию ароматических (бензоидных) соединений на биологические системы (ферменты, одноклеточные и многоклеточные организмы). Результаты исследований были опубликованы в ряде статей и обобщены в монографии [17].

Организацией внутриклеточных процессов не исчерпывается функция информационной системы клетки. Она обеспечивает адекватное реагирование последней на воздействие факторов внешней среды. Примерами таких реакций являются, в частности, соответствующие таксисы - направленные движения клетки, определяемые внешними стимулами (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис, магнитотаксис и др.). При этом свет в зависимости от интенсивности может выполнять функции или источника энергии (фотосинтез), или информационного сигнала (фототаксис). Субстраты или иные вещества (индукторы), находящиеся за пределами клетки, способны выступать в качестве сигналов, которые вызывают экспрессию генов, кодирующих, например, соответствующие гидролазы (экзоферменты).

Таким образом, ведущую роль в функционировании клетки играет поток информации, остальные два потока преимущественно обслуживают его веществом и энергией. Ни один из потоков в “чистом” виде, отдельно существовать не может, все они работают в клетке совместно, взаимно переплетены. Поэтому деление клеточных структур на выполняющие информационные, энергетические или вещественные функции имеет условный характер и основано на преобладании в их работе одного из трех потоков. В частности, ни один из участников каскадного информационного потока ДНК→РНК→фермент не является энергетическим сырьем или строительным материалом для внутриклеточных структур, но все они (ДНК, РНК, фермент) для своего воссоздания требуют затраты вещества и энергии. Переплетение информационной, энергетической и

вещественной функций происходит не только на уровне органелл, но и на уровне молекул. В частности, ферменты аминоксил-тРНК-синтетазы являются точками пересечения всех трех потоков. Конкретная аминоксил-тРНК-синтаза, как любой фермент, обладает субстратной специфичностью, благодаря чему соединяет “свою” аминокислоту (поток материи) с ее тРНК (элемент информационной системы) макроэргической связью, заимствованной у АТФ (энергетический поток). Этот фермент катализирует трехсубстратную реакцию и имеет, по крайней мере, три центра связывания (для аминокислоты, тРНК и АТФ), объединяя представителей трех потоков [18].

§ 4. Поток информации в клетке и его регуляция (на примере биосинтеза белка)

Поток информации в клетке обеспечивает ее самовоспроизведение, согласованную работу всех органелл и адекватное реагирование на факторы окружающей среды.

Структуры, организующие поток информации, имеют иерархическую соподчиненность. Высший уровень в иерархической пирамиде занимают молекулы ДНК, которые располагают наибольшей полнотой информации и стоят в начале ее потока. Подавляющая часть этой информации сосредоточена в ядерной (хромосомной) ДНК. Тиражирование последней и сохранность закодированной на ней информации обеспечивается работой молекулярных систем репликации и репарации. Помимо названных выше функций, связанных с работой единичной клетки или одноклеточного организма, уровень ДНК в многоклеточных организмах отвечает за их формирование, то есть организует в пространстве и во времени онтогенез каждого многоклеточного организма. О механизмах реализации морфогенетической информации в настоящее время практически ничего не известно, не существуют даже относительно правдоподобные соображения на этот счет. Поэтому о следующем за ДНК более низком иерархическом уровне можно говорить лишь применительно к управлению внутриклеточными процессами, где он представлен молекулами информационной РНК (иРНК, или мРНК). Формирование этого уровня происходит, как правило, за счет небольшой части информации генома путем транскрипции, осуществляемой с участием соответствующих молекулярных механизмов. Низший иерархический уровень образован белковыми молекулами, в первую очередь ферментами,

которые формируют метаболическую систему клетки и предназначены преимущественно для внутриклеточного “использования”. Белковый уровень формируется путем трансляции с участием информационных и транспортных РНК, рибосом и ряда ферментов.

Соподчиненность информационных иерархических уровней, задействованных в биосинтезе белка, реализована в форме соответствующей системы регуляции с обратными связями. Вербальную (и концептуальную) модель регуляции биосинтеза белка в прокариотической клетке (“модель оперона”) предложили в 1961 г. Ф.Жакоб и Ж.Моно. Основой для построения модели послужили результаты генетических и биохимических исследований усвоения лактозы клетками *E. coli*. Процессы регуляции описываются авторами с позиции контактных корпускулярных взаимодействий.

Регуляция биосинтеза белка в клетках *Metazoa* неизмеримо сложнее бактериальной. По этой причине до настоящего времени не предложена даже вербальная модель, способная аргументированно объяснить, в частности, механизмы дифференциальной активности генов при специализации клеток многоклеточных организмов, с которой напрямую связаны качественные и количественные различия в составе белков.

Регуляция синтеза белка может осуществляться путем репрессии и индукции. В первом случае, характерном для анаболических процессов, продукт реакции, катализируемой одним из ферментов, синтез которых регулируется, образует комплекс с неактивным репрессором; комплекс соединяется с геном-регулятором и блокирует работу соответствующих структурных генов (оперона). Во втором случае, имеющем место при катаболических процессах, субстрат регулируемых ферментов (индуктор) образует комплекс с репрессором и лишает его возможности соединиться с геном-оператором, благодаря чему работа соответствующего оперона оказывается незаблокированной.

С целью количественного анализа процесса регуляции биосинтеза белка были предложены математические модели Гудвина, Кюмпеля, Мастеза и Парди и др.

В качестве примера рассмотрим кинетику регуляции синтеза белка путем репрессии применительно к прокариотическим организмам [19-21]. Упрощенную вербальную модель этого процесса представим совместно со схемой регуляции (рис. 1.1). Участок молекулы ДНК, связанный с биосинтезом одного белка или нескольких ферментов метаболической цепи (E_1 , E_2 , E_3), состоит из оперона и гена-регулятора ГР. В состав оперона входят один или несколько струк-

турных генов СГ (цистронов), промотор П и оператор О. Применительно к рассматриваемому примеру регуляция осуществляется следующим образом. Ген-регулятор через процессы транскрипции и трансляции осуществляет синтез молекул репрессора пептидной природы Р, находящихся в неактивной форме. Соединяясь с мета-

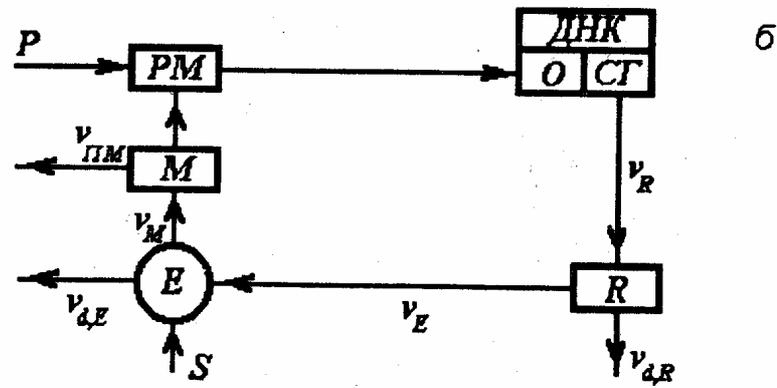
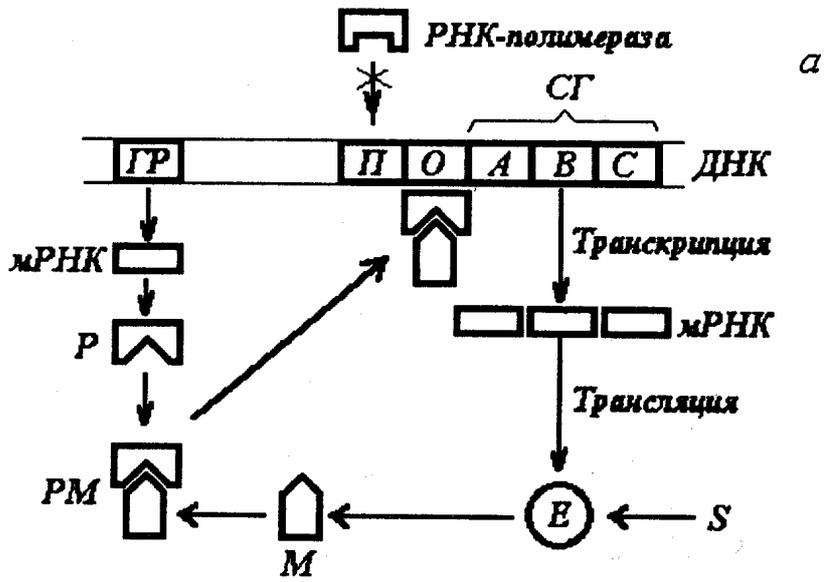


Рис. 1.1. Схема (а) и концептуальная модель (б) регуляции биосинтеза белка путем репрессии болитом М, который образуется при участии одного из ферментов Е

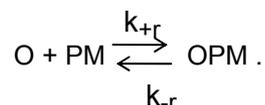
регулируемой цепи, репрессор переходит в активное состояние РМ.

Активный репрессор может обратимо присоединяться к оператору и преграждать продвижение ДНК-зависимой РНК-полимеразы от промотора, который утрачивает способность связываться с ней, к структурным генам А, В, С. С них РНК-полимераза в процессе транскрипции должна считывать генетическую информацию. Блокирование активным репрессором оператора делает невозможным процесс транскрипции, разблокирование оператора открывает путь РНК-полимеразе к структурным генам, в результате чего становится возможным синтез молекул мРНК (транскрипция). При участии сложных образований, включая надмолекулярные, происходит трансляция информации, содержащейся в молекуле мРНК, и синтез белков (E_1 , E_2 , E_3). Процессы транскрипции и трансляции требуют затраты энергии, поэтому они однонаправленные. Образующиеся белки, если они являются ферментами, осуществляют каталитическое превращение субстрата в метаболиты, один из которых (М) способен соединяться с репрессором Р. Изменение концентрации М ведет в конечном счете к изменению активности структурных генов и последующему изменению концентраций ферментов E_1 , E_2 , E_3 . Наряду с образованием молекул мРНК (обозначим их через R), белка (E_1 , E_2 , E_3) и метаболита М происходит их расходование. Молекулы мРНК и белка получают различные повреждения и деградируют при участии соответствующих катаболических ферментов, молекулы метаболита потребляются клеткой. Все это создает регулируемый молекулярный кругооборот.

На основании вербальной модели и схемы процесса регуляции биосинтеза белка с использованием уравнений кинетики реакций может быть построена математическая модель, позволяющая анализировать динамику регулирования. С целью упрощения модели вводятся некоторые обоснованные допущения. Рассмотрим постадийно кинетику реакций системы, которую можно представить в виде более удобной для анализа графической модели (рис. 1.1 б). Она в принципе напоминает схему регулирования скорости ферментативной реакции путем воздействия конечного продукта на аллостерический фермент по цепи обратной связи. Различие проявляется в структурно-функциональном содержании блоков системы биосинтеза белка. Если в цепи ферментативных реакций наиболее сложным блоком является олигомерный аллостерический фермент, то в системе биосинтеза белка принимают участие сложные надмолекулярные образования, включая рибосомы. Здесь в четко дифференцированной форме встречаются потоки материи (вещества), энергии и информа-

ции.

Построение математической модели регуляции биосинтеза белка в клетке начнем с рассмотрения скорости изменения концентрации мРНК $d[R]/dt$. Она складывается из скорости деградации и скорости образования молекул. Скорость образования мРНК в клетке прямо пропорциональна доле времени, в течение которого оперон находится в разблокированном (нерепрессированном) состоянии. Чтобы вычислить эту долю, рассмотрим клеточную популяцию с общей концентрацией операторов $[O_0]$. При имеющейся в объеме концентрации молекул активного репрессора $[PM]$ наступает состояние динамического равновесия между концентрациями свободных $[O]$ и заблокированных (репрессированных) оперонов $[OPM]$



Доля разблокированных оперонов от общего их числа

$$\frac{[O]}{[O_0]} = \frac{[O]}{[O] + [OPM]} \quad (1.3)$$

Подставляя в (1.3) значение

$$[OPM] = k_{+r}[O][PM]/k_{-r} = K_r[O][PM],$$

получим

$$\frac{[O]}{[O_0]} = \frac{1}{1 + K_r[PM]} \quad (1.4)$$

Скорость синтеза мРНК в клетке в отсутствие лимитирующих факторов прямо пропорциональна отношению $[O]/[O_0]$. Учитывая, что при $[O]/[O_0]=1$ значение $v_R=v_{R, \max}$, запишем выражение

$$v_R = \frac{v_{R, \max}}{1 + K_r[PM]} \quad (1.5)$$

Скорость деградации мРНК прямо пропорциональна ее концентрации

$$v_{d,R} = k_{d,R}[R], \quad (1.6)$$

где $k_{d,R}$ - константа скорости деградации.

Таким образом, скорость изменения концентрации мРНК

$$\frac{d[R]}{dt} = \frac{v_{R,max}}{1 + K_r[PM]} - k_{d,R}[R]. \quad (1.7)$$

Скорость изменения концентрации фермента $d[E]/dt$, катализирующего образование метаболита М, также складывается из скоростей его синтеза и деградации.

Скорость синтеза (трансляции) прямо пропорциональна концентрации мРНК (в отсутствие иных лимитирующих факторов), а скорость деградации прямо пропорциональна концентрации фермента:

$$d[E]/dt = k_E[R] - k_{d,E}[E]. \quad (1.8)$$

Скорость изменения концентрации метаболита $d[M]/dt$ складывается из скоростей его синтеза и потребления. Скорость синтеза (согласно уравнению Михаэлиса-Ментен)

$$v_M = k_{+2} \text{КИФ}[E], \quad (1.9)$$

где $\text{КИФ} = [S]/(K_m + [S])$, $[S]$ - концентрация субстрата.

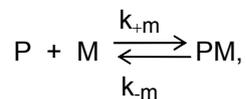
Скорость потребления будем считать прямо пропорциональной концентрации метаболита:

$$v_{PM} = k_{PM}[M]. \quad (1.10)$$

Скорость изменения концентрации метаболита

$$d[M]/dt = k_{+2} \text{КИФ}[E] - k_{PM}[M]. \quad (1.11)$$

Концентрация репрессора в активной форме (РМ) может быть найдена исходя из состояния равновесия



при котором

$$[PM] = \frac{k_{+m}}{k_{-m}} [P][M] = K_p [P][M]. \quad (1.12)$$

Поскольку система регулирования скорости реакции в цепи взаимосвязанных ферментов малоинерционна по сравнению с инерционной системой биосинтеза белка, можно считать, что концентрация метаболита М всегда поддерживается на постоянном уровне, то есть $d[M]/dt=0$. В этих условиях из (1.11) следует, что

$$[M] = \frac{k_{+2}}{k_{\text{ПМ}}} \cdot \text{КИФ}[E]. \quad (1.13)$$

Подставляя значение [М] из (1.13) в (1.12), получим уравнение для концентрации репрессора в активной форме:

$$[PM] = \frac{k_{+2}}{k_{\text{ПМ}}} \cdot \text{КИФ} \cdot K_p \cdot [P][E]. \quad (1.14)$$

Заменяя в (1.7) значение [PM] полученным выражением (1.14), находим

$$\frac{d[R]}{dt} = \frac{v_{R,\max}}{1 + K_r K_p [P] \text{КИФ} (k_{+2}/k_{\text{ПМ}}) [E]} - k_{d,R} [R]. \quad (1.15)$$

Вводя в это уравнение новые обозначения для постоянных выражений:

$$\begin{aligned} a &= v_{R,\max}; & b &= k_{d,R}; \\ c &= K_r K_p [P] \text{КИФ} (k_{+2}/k_{\text{ПМ}}) \\ & \text{([P] и КИФ считаем постоянными)}. \end{aligned}$$

В уравнении (1.8) для удобства записи также заменяем обозначения постоянных:

$$l = k_E; \quad f = k_{d,E}.$$

После этого получим систему из двух дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} 1) \quad d[R]/dt &= \frac{a}{1 + c[E]} - b[R], \\ 2) \quad d[E]/dt &= l[R] - f[E]. \end{aligned} \quad (1.16)$$

которые отражают динамику связи между концентрациями мРНК и транскрибируемого с нее фермента Е во времени. Найдем значение концентрации мРНК и фермента Е, при которых система находится в состоянии динамического равновесия. Для этого в уравнениях сис-

темы (1.16) приравняем к нулю скорости $d[R]/dt$ и $d[E]/dt$:

$$1) \frac{a}{1 + c[\tilde{E}]} - b[\tilde{R}] = 0; \quad 2) l[\tilde{R}] - f[\tilde{E}] = 0. \quad (1.17)$$

Совместное решение этих двух уравнений позволяет найти значения равновесных концентраций $[\tilde{E}]$ и $[\tilde{R}]$

$$[\tilde{E}] = -\frac{1}{2c} + \sqrt{\frac{1}{4c^2} + \frac{al}{bfc}}$$

$$[\tilde{R}] = \frac{f}{l}[\tilde{E}]. \quad (1.18)$$

Перенесем начало координат в точку, соответствующую состоянию равновесия ($[\tilde{E}], [\tilde{R}]$), и обозначим новые оси соответственно через x (отклонение $[E]$ от состояния равновесия) и y (отклонение $[R]$ от состояния равновесия). В результате этих преобразований получим систему уравнений:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{d(y + [\tilde{R}])}{dt} = \frac{a}{1 + c(x + [\tilde{E}])} - b(y + [\tilde{R}]) = -Fx - by$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{d(x + [\tilde{E}])}{dt} = ly - fx + l[\tilde{R}] - f[\tilde{E}] = ly - fx, \quad (1.19)$$

где $F = ac / (1 + c[\tilde{E}])^2$; $l[\tilde{R}] - f[\tilde{E}] = 0$ (1.17).

Исследование системы на устойчивость проводится вблизи области равновесия. Решение характеристического уравнения (подробнее см. [21]) дает следующие значения корней:

$$\lambda_{1,2} = -\frac{b+f}{2} \pm \frac{\sqrt{(b-f)^2 - 4Fl}}{2}.$$

Если подкоренное выражение положительное ($(b-f)^2 - 4Fl > 0$), то λ_1 и λ_2 отрицательные. Этому случаю соответствует возвращение системы после отклонения концентрации мРНК от состояния равновесия на величину y_0 в него без колебания (рис. 1.2а).

Если подкоренное выражение отрицательное, то λ_1 и λ_2 - комплексные величины:

$$\lambda_{1,2} = -\beta \pm i\alpha,$$

где $\beta = (b + f) / 2$; $\alpha = (\sqrt{4Fl - (b - f)^2}) / 2$; $i = \sqrt{-1}$.

Этому случаю соответствуют два варианта поведения системы. При $\beta = (b + f) / 2 \neq 0$ система придет в исходное состояние равновесия через колебания с затухающей амплитудой (рис. 1.2б). Если же $\beta=0$, в системе установятся незатухающие колебания концентраций [E] и [R] с постоянной амплитудой (предельный цикл) (рис. 1.2в).

Период колебаний

$$T = 4\pi\sqrt{4Fl - (b - f)^2}. \quad (1.20)$$

Функционирующая клетка содержит очень большое количество осцилляторов, генерирующих колебания концентраций макромолекул и метаболитов. Широко представлены окологасовые ритмы синтеза белка [22]. Они складываются с более высокочастотными колебаниями молекул в метаболических системах. Колебания параметров, как правило, сопутствуют процессам управления любыми системами, включая технические. Применительно к биологическим системам, где колебательные процессы представлены очень широко, возникает естественный вопрос о какой-то особой роли их в функционировании клетки. Делаются попытки связать эти колебания с работой биологических часов [20].

У прокариотов возможна и более сложная регуляция синтеза белка путем индукции транскрипции субстратом и репрессии метаболитом с вовлечением в регуляцию генов, не входящих в классическую схему оперона (рис. 1.3).

Объектом управления (ОУ) в рассматриваемой схеме является лактозный оперон (комплекс структурных генов А,В,С), результатом экспрессии которого в конечном счете является биосинтез: β -галактозидазы, катализирующей гидролиз лактозы до β -галактозы и глюкозы; пермеазы, обеспечивающей активный транспорт лактозы в клетку; трансацетилазы, роль которой недостаточно изучена.

В данной схеме предполагается вероятность постоянного функционирования всех генов-регуляторов и, соответственно, постоянный синтез регуляторных белков, кодируемых ими (Р, РНК-полимераза, БАК, АЦ). Один из регуляторных белков (Р) имеет специфическое сродство к гену-оператору, присоединяется к нему, блокируя тем самым движение РНК-полимеразы к структурным генам и предотвращая транскрипцию мРНК. Для снижения сродства связывания белка-репрессора (Р) с оператором необходимо присутствие молекул индуктора, в данном случае

лактозы, которая препятствует присоединению белка Р к оператору и открывает возможность транскрипции.

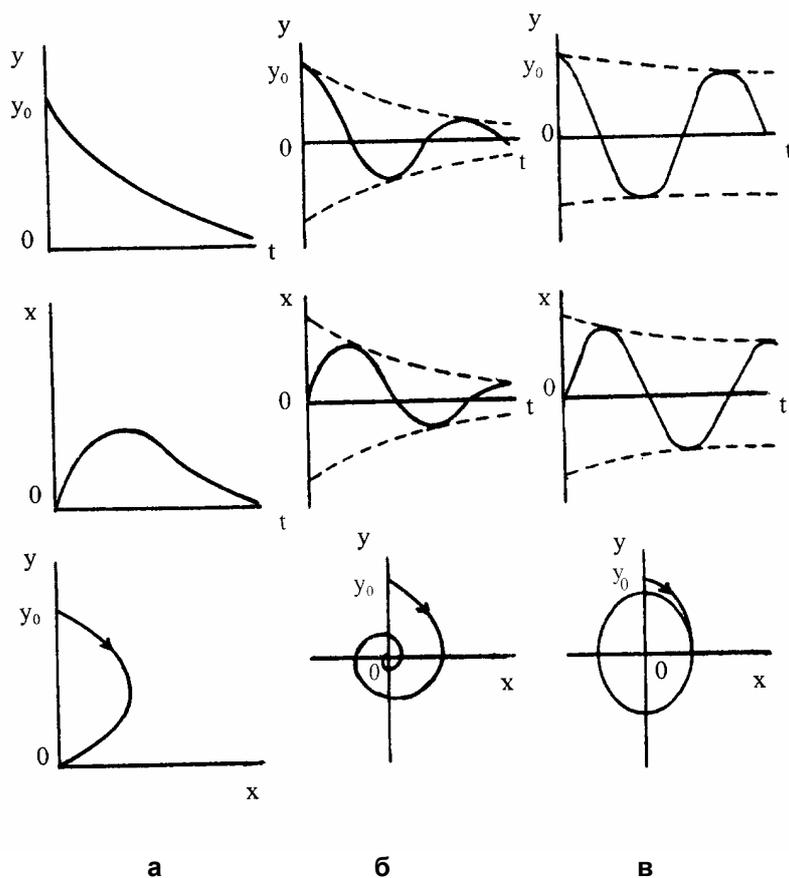


Рис.1.2. *Различные варианты реакции системы биосинтеза белка на отклонение от состояния равновесия концентрации мРНК (y_0). На графиках: x и y - соответственно текущие значения концентраций фермента и мРНК, t - время*

Однако для регуляции лактозного оперона необходимо наличие в клетке не только белка-репрессора (Р) и индуктора - лактозы, но и других регуляторов. Дело в том, что РНК-полимераза, кодируемая ГР_2 , с помощью своей субъединицы σ (сигма) "узнает" участок гена-промотора, примыкающий непосредственно к оператору, присоединяется к нему и начинает транскрипцию лишь после присоединения к другому участку промотора (удаленному от оператора) специального белка. Этот белок активатор катаболизма (БАК), кодируемый ГР_3 , имеет и другие названия: АКГ (активатор катаболитных генов), ЦСБ (циклосвязывающий белок).

БАК является аллостерическим белком основного характера и благодаря этому может связываться с промотором ДНК и с цАМФ. Но если БАК по отношению к цАМФ обладает высоким сродством, то по отношению к ДНК - низким сродством, которое повышается в присутствии цАМФ. Присоединение цАМФ к БАК вызывает в нем конформационные изменения, необходимые для связывания БАК (в комплексе с цАМФ) с промотором.

цАМФ образуется из АТФ при участии фермента аденилатциклазы (АЦ), кодируемого ГР_4 . В регуляции концентрации цАМФ в клетке принимает участие глюкоза - метаболит, образующийся при гидролизе лактозы. Глюкоза снижает уровень цАМФ в клетках *E. coli*, вызывая быстрый выход из клетки уже имеющегося в ней цАМФ и ингибируя образование нового цАМФ. В отсутствие (или при недостатке) цАМФ не может произойти активация БАК и его присоединение к промотору, без чего невозможно функционирование РНК-полимеразы. В результате синтез β -галактозидазы не происходит даже в присутствии достаточного количества индуктора (лактозы). Добавление к питательной среде цАМФ активирует БАК, стимулируя синтез β -галактозидазы и тем самым способствуя гидролизу лактозы и катаболизму продуктов гидролиза лактозы.

Для транскрипции мРНК необходимо одновременное наличие БАК и цАМФ. У мутантов *E. coli*, дефицитных по АЦ, синтез мРНК и β -галактозидазы не происходит в отсутствие цАМФ, а у мутантных по БАК - без добавок этого белка. Максимальная скорость синтеза β -галактозидазы достигается только при одновременном внесении в среду цАМФ и БАК (при условии наличия в питательной среде достаточного количества лактозы).

При выращивании *E. coli* в отсутствие лактозы, ее клетки содержат ничтожное количество β -галактозидазы. Если же в питательную среду внести лактозу, то начинается образование β -галактозидазы, содержание которой может повыситься на 3-4 порядка [24]. Следова-

тельно, в данном случае субстрат путем дерепрессии оператора индуцирует появление большого количества фермента, способного использовать этот субстрат. Индуцированный синтез ферментных молекул начинается через 1-2 минуты после добавления индуктора. Если индуктор удаляют, то синтез прекращается через такое же время.

Повышение концентрации глюкозы - метаболита субстрата (лактозы), одновременно выполняющего роль индуктора, прекращает "работу" лактозного оперона вследствие резкого снижения концентрации цАМФ в клетке и невозможности присоединения (без цАМФ) БАК к промотору, что препятствует присоединению РНК-полимеразы к промотору и ее участию в транскрипции. То же самое происходит при добавлении в питательную среду избытка глюкозы, даже в присутствии достаточного количества субстрата-индуктора (лактозы).

Рассмотренная схема относится к числу комбинированных систем управления [92]. Роль управляющих структур (УС) выполняют гены-регуляторы ($ГР_1$, $ГР_3$, $ГР_4$) со своими белками (репрессором Р, БАК, АЦ). Исполнительными структурами (ИС) являются промотор (П) и оператор (О), которые стоят на пути РНК-полимеразы к лактозному оперону и **непосредственно** определяют ее судьбу в отношении транскрипции. ИС работают по принципу "все или ничего": транскрипция генов А,В,С произойдет в случае "положительного решения" промотора и оперона. Концентрация лактозы оказывает возмущающее воздействие (М), положительно влияя на транскрипцию. Концентрация глюкозы выполняет роль отрицательной обратной связи (У), тормозящей транскрипцию. Если концентрация глюкозы превысит определенное значение (Y_0), РНК-полимераза не сможет соединиться с промотором и транскрипция не начнется даже при высокой концентрации лактозы.

Таким образом, у прокариотов для активации группы функционально связанных генов помимо индуктора (в данном случае - лактозы) необходим как бы сигнал голода (в данном примере - недостаток или отсутствие в клетке глюкозы), стимулирующий образование в клетке цАМФ, выполняющего роль инициатора начала транскрипции и последующей трансляции, которые приводят к повышению скорости процессов внутриклеточного метаболизма. Появление в клетке (или повышение концентрации) глюкозы в свою очередь является сигналом для снижения концентрации цАМФ и, соответственно, для прекращения транскрипции и трансляции. Следовательно, у прокариотов сигналами, по которым изменяется содержание цАМФ в клетке, а отсюда скорость и направление метаболических процессов,

являются колебания содержания метаболитов в клетке.

Исходя из концепции А.М. Уголева об универсальных функциональных блоках [25], которые мало меняются в ходе эволюции, близки или идентичны у организмов, стоящих на разных уровнях эволюционной лестницы, а также учитывая, что цАМФ выполняет роль универсального регулятора метаболизма не только у прокариотов, но и у эукариотов, в том числе у млекопитающих [26-29], можно было предположить наличие сходного с прокариотами механизма инициации транскрипции и у высших организмов.

Первоначально казалось, что у эукариотов роль цАМФ, содержание которого в клетке регулируется гормонами и другими биологически активными веществами, сводится лишь к активации протеинкиназ путем присоединения цАМФ к их регуляторной (рецепторной) субъединице [28]. Сходство с прокариотами обнаруживалось лишь в одном. И у бактерий, и у животных цАМФ влияет на процессы обмена веществ путем взаимодействия с обладающим к нему сродством белком: у бактерий - вызывая конформационные изменения БАК в комплексе цАМФ-БАК и способствуя присоединению БАК, а затем и РНК-полимеразы к промотору; у животных - связывая регуляторную субъединицу и тем самым активируя фосфорилирующую каталитическую субъединицу протеинкиназы (рис. 1.4), которая, фосфорилируя гистоновые или негистоновые белки хроматина (рис. 1.5), вызывает дерепрессию определенных участков ДНК и стимулирует синтез строго определенных для каждого гормона фракций РНК.

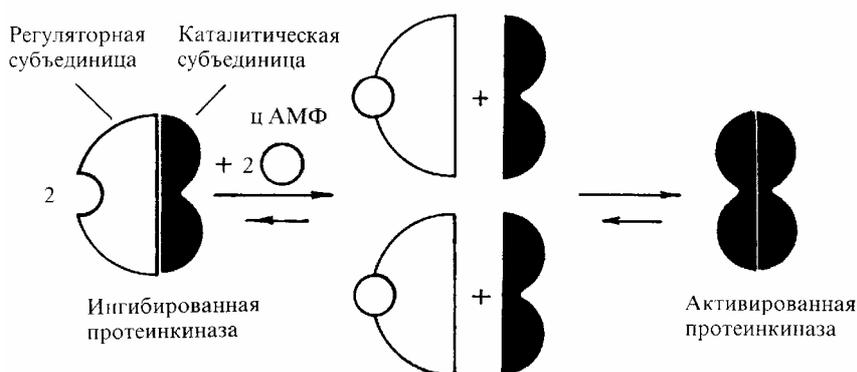


Рис. 1.4. Механизм активации протеинкиназы цАМФ (Gill, 1972 -

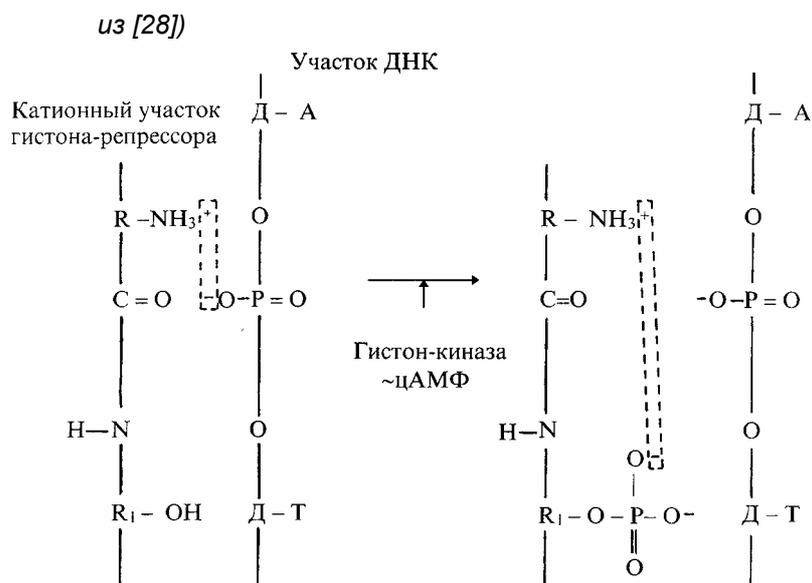


Рис. 1.5. Схема дерепрессии гена путем фосфорилирования гистонов-репрессоров: R - остаток лизина; R₁ - остаток серина; А, Т - азотистые основания; Д- дезоксирибоза

Считалось, что комплекс цАМФ с регуляторной субъединицей малоактивен и остается в цитоплазме. В последующем появились данные, что возможна транслокация в ядро и самостоятельное функционирование в нем и каталитической, и регуляторной (в комплексе с цАМФ) субъединиц цАМФ-зависимых протеинкиназ. Для проверки предположения о том, что регуляторная субъединица протеинкиназы может влиять на уровень транскрипции, непосредственно взаимодействуя с матрицей по типу цАМФ-связывающего белка бактерий, было изучено изменение матричной активности хроматина под влиянием обработки регуляторной субъединицей в системе *in vitro*. Оказалось, что гомогенная регуляторная субъединица протеинкиназы из мозга свиньи при добавлении в стандартную РНК-полимеразную систему увеличивает матричную активность хроматина за счет увеличения числа мест инициации РНК. На основе экспериментов высказано предположение, что транслокация в ядро регуляторной субъединицы осуществляется независимо от каталитической

ской и определяется специфическим взаимодействием с молекулами цАМФ [27].

В соответствии с вышеизложенным можно считать вполне вероятным, что функциональный блок, регулирующий транскрипцию у прокариотов (цАМФ-БАК-промотор-РНК-полимераза), сохранился в процессе эволюции, выполняя подобную же функцию у животных и человека. Однако вследствие усложнения структуры хроматина (наличие гистоновых и негистоновых белков, препятствующих доступу регуляторных эффекторов и РНК-полимеразы к промотору ДНК) у животных и человека универсальный функциональный блок регуляции транскрипции также усложнялся за счет каталитической субъединицы, которая соединена и функционально сопряжена с регуляторной (цАМФ-зависимой) субъединицей протеинкиназы. Инициация синтеза цАМФ (гормонами, медиаторами и другими биологически активными веществами) ведет к повышению концентрации цАМФ в клетке, присоединению цАМФ к регуляторной субъединице протеинкиназы, что приводит к отделению от нее и активации каталитической субъединицы. И каталитическая, и регуляторная субъединицы проникают в ядро, выполняя каждая свои функции. Каталитическая субъединица специфически фосфорилирует белки хроматина, деблокируя определенные участки ДНК, обеспечивая доступ к промотору комплекса цАМФ и регуляторной субъединицы, после присоединения которого к промотору иницируется присоединение к нему РНК-полимеразы и начало транскрипции.

Можно полагать, что каталитические (фосфорилирующие) субъединицы обладают специфичностью "узнавать" определенные белки хроматина, а через них и определенные участки ДНК. Комплекс же цАМФ с регуляторной субъединицей менее специфичен, активируя освободившиеся (при участии каталитической субъединицы) от белка опероны.

Появившиеся в процессе эволюции каталитические субъединицы протеинкиназ у животных участвуют, путем фосфорилирования белков, не только в регуляции активности генов, но и в регуляции активности ферментов (например, активация в клетках печени фосфорилазы и ингибирование гликогенсинтетазы), проницаемости мембранных каналов, функционирования рибосом, эндоплазматического ретикулума и др.

Ответ клетки на тот или иной гормон или другие биологически активные вещества, действующие через цАМФ-зависимые протеинкиназы, обусловлен набором в клетке тех или иных обладающих специфичностью действия протеинкиназ.

§ 5. Управление биосинтезом белка

Рассмотренные системы регуляции биосинтеза белка совместно с системами регуляции материального и энергетического потоков осуществляют уравнивание всех трех потоков, приводят во взаимное соответствие их мощности. Если для выполнения какой-то анаболической работы требуются определенные количества информации, вещества и энергии, соответствующие системы регуляции обеспечивают ими анаболический процесс в требуемых количествах. Кроме того, названные системы согласуют мощности трех потоков с возможностями клетки. Клеточные системы регуляции организуют слаженную работу всех составных частей клетки, позволяя ей выполнять свои жизненные функции. Последние не всегда совпадают с потребностями людей, использующих эти клетки в своих практических целях. Вмешательство человека в работу клеток воспринимается ими обычно как неблагоприятное воздействие, для нейтрализации которого системы регуляции мобилизуют отработанные в процессе эволюции механизмы защитного реагирования. Это обстоятельство должно учитываться при управлении клеткой. Стратегия управления должна базироваться или на умелом использовании имеющихся систем клеточной регуляции, или на их модификации. В первом случае управление осуществляется только за счет изменения параметров управляющих воздействий при полном сохранении систем регуляции. Во втором случае цели управления достигаются путем нейтрализации или модификации отдельных звеньев систем регуляции, а также введения в них новых структурных элементов. Возможно и сочетание этих двух стратегий управления.

В естественных условиях системы регуляции поддерживают внутриклеточный гомеостаз на фоне изменяющихся условий внешней среды, которая оказывает на клетку своего рода управляющие воздействия. В искусственных условиях целенаправленное управляющее воздействие на системы регуляции клетки оказывает человек. В связи с тем, что иерархические уровни системы регуляции находятся между собой в тесном взаимодействии, управление работой клетки можно осуществлять на любом из трех названных уровней (рис. 1.6), при этом к управлению автоматически подключаются и остальные уровни.

Поскольку в работе системы регуляции принимает участие большое количество разнонаправленно действующих звеньев, оценить суммарный вклад их в конечный результат на основе анализа вербальной или концептуальной модели оказывается практически невозможным. В этом случае большую помощь оказывает даже предель-

но упрощенная математическая модель, подобная той, которая была рассмотрена в предыдущем параграфе. В частности, из ее анализа следует, что в зависимости от численных значений параметров, входящих в уравнение, после прекращения действия возмущения система может вернуться в исходное состояние по плавной неколебательной траектории или путем серии затухающих колебаний (с убывающей амплитудой). Кроме того, она может не вернуться на исходный уровень, а перейти в состояние динамического равновесия, совершая около него незатухающие колебания с постоянной амплитудой и частотой (предельный цикл), чему способствует наличие временных задержек в работе звеньев системы, обусловленных процессами диффузии молекул. Энергетическим источником предельного цикла являются экзэргонические биохимические реакции, которые подобно заведенной пружине часов поддерживают эти колебания на постоянном уровне.

Одним из продуктов, который получают при культивировании клеток, является какой-то конкретный фермент (E), поэтому желательно, чтобы его равновесная концентрация $[\tilde{E}]$ в клетке была наиболее высокой. Согласно (1.18) значение $[\tilde{E}]$ прямо пропорционально максимальной скорости транскрипции ($a = v_{R,max}$) и скорости трансляции в расчете на единицу концентрации мРНК ($l = k_E$); в то же время оно обратно пропорционально интенсивности процессов деградации молекул мРНК ($b = k_{d,R}$) и фермента E ($f = k_{d,E}$). Анализ зависимости $[\tilde{E}]$ от c показывает, что с увеличением c значение $[\tilde{E}]$ снижается, вначале быстро, затем все более медленно. Поскольку $c = K_r K_p [P] \cdot \text{КИФ} \cdot (k_{+2}/k_{PM})$, то для повышения $[\tilde{E}]$ и эффективности воздействия названных выше параметров ($v_{R,max}$, k_E , $k_{d,R}$, $k_{d,E}$) необходимо уменьшить значение K_r (сродство активного репрессора РМ к оператору О), K_p (сродство репрессора Р к метаболиту М), концентраций репрессора Р и субстрата S, из которого образуется метаболит М (через значение КИФ), а также константы скорости образования М (k_{+2}); уменьшению значения c способствует увеличение константы скорости потребления метаболита М (k_{PM}).

Таким образом, даже предельно упрощенная математическая модель позволяет выявить зависимость $[\tilde{E}]$ от десяти параметров (из них три комплексные: $K_r = k_{+r}/k_{-r}$, $K_p = k_{+p}/k_{-p}$, $\text{КИФ} = [S]/(K_m + [S])$) и указать, в каком направлении необходимо изменять их значения, чтобы

добиться более высокой равновесной концентрации фермента $[\tilde{E}]$. В эту математическую модель не вошли многие параметры, в ряде случаев очевидным образом влияющие на $[\tilde{E}]$. В частности, на скорости энергозависимых биохимических реакций напрямую (или косвенно) влияет концентрация АТФ и других макроэргических соединений. На скорость транскрипции оказывает влияние концентрация РНК-полимеразы и других участников этого процесса, включая нуклеотиды, а также степень амплификации структурного гена (если таковая имеется). Скорость трансляции зависит от количества рибосом в клетке, концентрации мРНК и других участников биосинтеза белка, включая аминокислоты. Кроме того, на скорость трансляции может влиять и ретроингибирование. Например, синтез пептидных цепей гемоглобина в ретикулоцитах происходит только в присутствии гема, и образующиеся пептидные цепи тут же соединяются с гемом. При низкой концентрации гема активируется ингибитор инициации белкового синтеза и синтез глобина замедляется [30]. На скорость образования конечного метаболита М функционального блока, помимо вошедших в математическую модель концентраций фермента и субстрата (через значение КИФ), оказывает влияние ретроингибирование метаболитом М аллостерического фермента и, в ряде случаев, активирование его промежуточными метаболитами, что не нашло отражения в рассмотренной модели.

Между равновесными концентрациями фермента и его мРНК существует прямо пропорциональная зависимость (1.18): $[\tilde{R}] = \frac{f}{l} [\tilde{E}]$.

Для приведенной выше вербальной (и концептуальной - рис. 1.3) модели регуляции синтеза белка, включающей дополнительно индукцию транскрипции субстратом, математическая модель будет более сложной и одновременно более информативной в отношении способов целенаправленного воздействия на метаболизм клетки. В настоящее время разработаны конкретные механизмы реализации таких возможностей.

Анализ процессов регуляции биосинтеза белка свидетельствует о том, что в клетке, как и в любой сложной системе, имеет место сочетание централизованного (ДНК) управления с автономным (транскрипция, трансляция, метаболизм). Полная автономия подсистем - это анархия, полная централизация управления - практически нереализуема. Оптимальный вариант - их сочетание. ДНК как высший уровень информации и управления совместно с обслуживающими его

макромолекулами задает и поддерживает определенное, эволюционно выработанное соотношение уровней метаболической активности многочисленных функциональных блоков клетки (биохимических звеньев метаболической системы). В то же время ДНК - это "пианино", на клавишах которого играют обратные связи нижних уровней. Настройка его на поддержание гомеостаза клетки и устойчивое прохождение ей жизненного цикла (гомеорез) осуществляется прежде всего на уровне генов-регуляторов.

ДНК выполняет как минимум три основные функции: строит клетку, воссоздает и "ремонтирует" себя (редупликация и репарация) и главное управляет работой многочисленных структур, созданных при ее ведущем участии. Эта интегративная функция ДНК в клетке напоминает функцию ЦНС в многоклеточном организме.

§ 6. Поток энергии в живых системах и управление им

Одной из неотъемлемых функций живой клетки является способность к энергообеспечению, которое состоит в использовании внешних энергетических ресурсов для осуществления процессов жизнедеятельности.

Основным источником внешней энергии на Земле для всех живых систем является энергия Солнца, которая используется одними живыми организмами (автотрофами, преимущественно растениями) непосредственно - для синтеза углеродсодержащих биомолекул из свободной (атмосферной) CO_2 или косвенно (гетеротрофами), - через продукты жизнедеятельности других организмов.

За счет солнечной энергии в хлоропластах растений идут одновременно две реакции: реакция фотофосфорилирования



и реакция освобождения из воды атомов водорода, необходимых для восстановления CO_2 ,



В последующих ферментативных реакциях за счет энергии АТФ в растениях происходит образование сначала 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГК) - за счет CO_2 и рибозо-5-фосфата, а затем - при

участии НАДФН (также за счет энергии АТФ) происходит восстановление 3-ФГК в 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА). 3-ФГК и 3-ФГА служат в растениях исходными метаболитами для синтеза углеводов, липидов, белков и других органических соединений.

Цикл АТФ-АДФ представляет собой основной механизм обмена энергии в биологических системах, так как и животные, и растения, и бактерии используют АДФ и АТФ для сопряжения реакций освобождения энергии с процессами, требующими энергизатрат [31]. АТФ часто называют высокоэнергетическим фосфатным соединением, и его фосфоангидридные связи относят к высокоэнергетическим связям в том смысле, что при их гидролизе высвобождается большое количество свободной энергии.

АТФ является главным непосредственно используемым донором свободной энергии в биологических системах, а не формой запасания свободной энергии. В обычной клетке молекула АТФ расходуется в течение одной минуты после ее образования. Оборот АТФ очень высок. Например, человек в покое расходует около 40 кг АТФ за 24 часа, а во время интенсивных упражнений скорость использования АТФ может достигнуть 0,5 кг/мин.[32]. В.П. Скулачев [31] сравнивает АТФ с аккумулятором, способным заряжаться от различных генераторов и снабжать энергией множество машин и аппаратов. Зарядка аденилового "аккумулятора" состоит в фосфорилировании АДФ, превращающегося в АТФ, а разрядка "аккумулятора" сопровождается распадом (дефосфорилированием) АТФ.

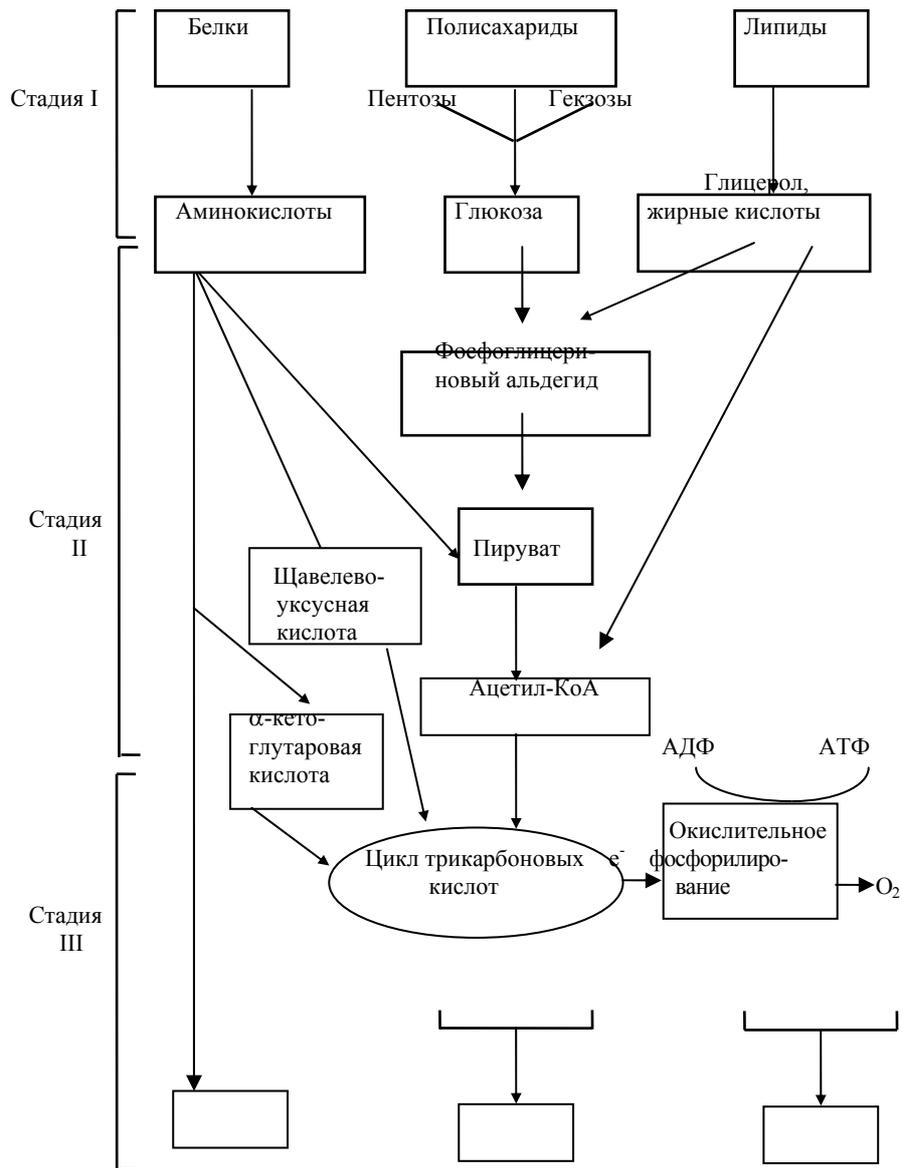
Зарядка адениловой системы (фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом) требует затраты энергии в количестве 10 ккал/моль при физиологических концентрациях АДФ и неорганического фосфата за счет внешних энергетических ресурсов. Живой организм требует для зарядки "аккумулятора" специального горючего точно так же, как любая машина. Таким горючим являются питательные вещества.

Процесс освобождения энергии при сгорании питательных веществ в живых организмах можно расчленить на три основные стадии (рис. 1.7).

В стадии I освобождается относительно небольшое количество энергии - около 0,6% запаса свободной энергии полисахаридов и белков и около 0,1% свободной энергии триглицеридов. Освобождающаяся в этой стадии энергия расходуется на теплопродукцию [33].

В стадии II происходит неполное сгорание различных мелких молекул, образующихся в стадии I, до ацетилкоэнзима А (Ацетил-КоА), щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот с освобождением до одной трети общей энергии.

В стадии III ацетил-КоА, щавелевоуксусная и α -кетоглутаровая кислоты вступают в цикл трикарбоновых кислот, в котором освобождается две трети общей энергии.



NH_3

CO_2

H_2O

Рис. 1.7. Стадии извлечения энергии из пищевых веществ

Цикл трикарбоновых кислот занимает особое место в обмене веществ всех живых организмов - от одноклеточных до высших позвоночных животных. У большинства микроорганизмов комплекс ферментов этого цикла локализован на поверхности клеточных мембран, у животных и в растениях - в митохондриях. Наличие общего конечного пути окисления для всех питательных веществ позволяет значительно экономить ферментные системы, ведет к образованию общих метаболитов, а через обратимость действия ферментов - к взаимосвязи обмена белков, липидов и углеводов.

В цикле трикарбоновых кислот образуются восстановленные коферменты - НАДН, НАДФН, ФАДН₂. Эти же коферменты (НАДН, ФАДН₂) образуются и в предшествующие циклу трикарбоновых кислот стадии (при гликолизе углеводов, β-окислении жирных кислот, окислительном дезаминировании и карбоксилировании продуктов распада аминокислот и других органических веществ).

Существует фундаментальное различие между НАДН и НАДФН в большинстве биохимических реакций. НАДН окисляется дыхательной цепью ферментов сопряженно с генерированием АТФ, тогда как НАДФН служит преимущественно донором водорода и электронов при восстановительных биосинтезах.

Восстановительные коферменты (НАДН и ФАДН₂) у аэробных организмов доставляют свои обладающие высоким энергетическим потенциалом электроны к O_2 по цепи переноса электронов. Во внутренней мембране митохондрий процесс переноса электронов, сопровождающийся освобождением энергии, сопряжен с образованием АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Этот процесс принято называть окислительным фосфорилированием. Примерно 40-50% энергии, освобождающейся при окислении органических веществ, используется для образования макроэргических связей АТФ, а 50-60% рассеивается в виде тепловой энергии, которая организмом использоваться не может и теряется (у теплокровных эта энергия частично участвует в поддержании температуры тела). Это соотношение (примерно 50% энергии биологического окисления для синтеза АТФ и 50% - рассеивание в виде тепловой энергии) как правило сохраняется и при повышении, и при понижении интенсивности окислительных процессов.

Как известно, сопряжение процессов биологического окисления и окислительного фосфорилирования происходит за счет АТФ-азы сопрягающих мембран (внутренние мембраны митохондрий, мембраны тилакоидов хлоропластов, клеточные мембраны микроорганизмов). АТФ-аза сопрягающих мембран способна осуществлять не только гидролиз АТФ, но и ее синтез путем переноса протонов через мембрану (рис.1.8).

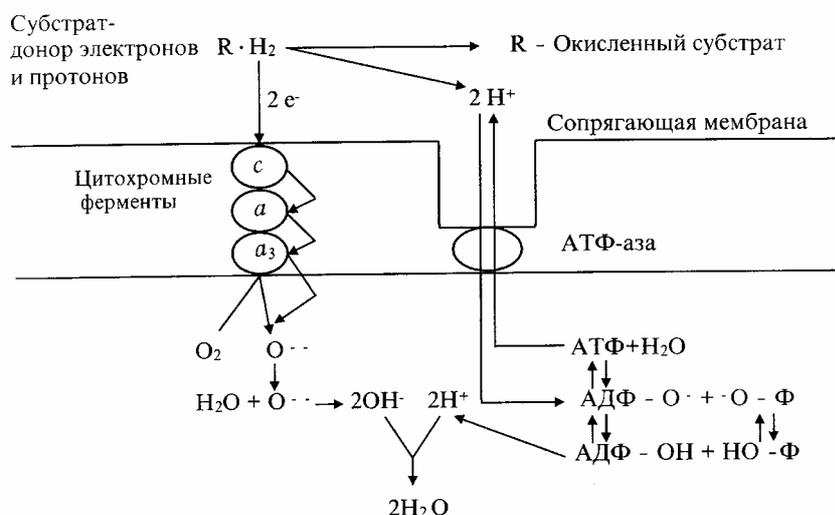


Рис.1.8. Схема сопряжения окисления и фосфорилирования (по работам П. Митчелла и В.П.Скулачева)

В механизме окислительного фосфорилирования еще не все ясно. Но уже не вызывает сомнений факт, что образованию АТФ в митохондриях при биологическом окислении предшествует возникновение мембранного потенциала. В то же время доказано, что АТФ-аза в присутствии АТФ образует мембранный потенциал без посредничества окислительных систем и что превращение энергии АТФ в мембранный потенциал обратимо [31,34].

Вышеуказанная схема свидетельствует о том, что наряду с АТФ, занимающим центральное место в механизме трансформации энергии в клетке, существует еще одна конвертируемая и транспортабельная форма энергии в клетке - трансмембранный потенциал

ионов водорода, представляющий собой разность электрических потенциалов H^+ ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) на сопрягающей мембране [34].

АТФ достаточно стабилен, чтобы аккумулировать и хранить энергию, и в то же время он может легко распадаться при участии АТФ-азы с освобождением энергии, необходимой для работы мышц, деятельности центральной нервной системы, синтетических процессов, секреции и др.

С использованием трансмембранного потенциала ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) сопряжены следующие типы жизненной активности [34]: химическая работа (синтез АТФ и неорганического пирофосфата, обратный перенос электронов к НАД⁺ и НАДФ⁺); осмотическая работа (активный транспорт различных соединений через сопрягающие мембраны митохондрий и хлоропластов животных и растительных клеток, неравномерное распределение многих веществ между внутри- и внеклеточным пространством у микроорганизмов); механическая работа (движение бактерий посредством жгутиков - за счет откачивания ионов H^+ из цитоплазмы в окружающую среду белками - генераторами трансмембранного потенциала, с последующим возвращением ионов H^+ в цитоплазму через жгутик); производство тепла (терморегуляторное разобщение окислительного фосфорилирования, вызываемое холодом - за счет выделения норадреналина, с последующим усилением липолиза и повышением H^+ -проводимости митохондриальной мембраны при повышении концентрации неэтерифицированных жирных кислот).

Некоторые биосинтетические реакции запускаются нуклеотидами, аналогичными АТФ, а именно УТФ, ГТФ, ЦТФ. Кроме того, в мышечных клетках и клетках мозга обнаружен в относительно высоких концентрациях креатинфосфат (КрФ), также имеющий высокоэнергетическую связь, энергия гидролиза которой, однако, может быть использована клеткой только после ее передачи на АДФ с последующим образованием АТФ.

Для синтеза АТФ в митохондриях необходимо наличие АДФ, и в то же время поступление АДФ в митохондрии требует выхода из них АТФ; АТФ и АДФ проходят через внутреннюю митохондриальную мембрану благодаря наличию специфического переносчика (АТФ-АДФ-транслоказы), составляющего до 6% общего белка внутренней мембраны митохондрий [32].

Вопрос о путях транспорта энергии АТФ из митохондрий к местам его использования в энергозависимых процессах клетки до сих пор

остаётся дискуссионным. Долгое время считалось, что транспорт АТФ и АДФ в клетках, в том числе и мышечных, осуществляется путем их диффузии ([35 и др., цит. по [36]).

В последующем было установлено, что перенос энергии по цитоплазме затруднен внутриклеточными мембранами [34], в том числе внешней мембраной митохондрий. В настоящее время известно, что для проникновения АТФ через клеточную мембрану требуется большое количество энергии [37].

Открытие роли трансмембранного потенциала в сопряжении окисления и фосфорилирования, а также синтеза КрФ за счет АТФ в митохондриях и обратного процесса в различных частях цитоплазмы (при участии креатинкиназ) привело к появлению двух гипотез о возможных путях транспорта энергии в клетке.

В.П.Скулачев [34] считает, что транспорт энергии в клетке происходит преимущественно в форме трансмембранного потенциала ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) вдоль сопрягающих мембран, объединяющих тысячи от-

дельных генераторов $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ в общую систему энергообеспечения

клетки. У бактерий в организации такой системы может участвовать цитоплазматическая мембрана, у эукариотов - внутренняя мембрана гигантских митохондрий. По В.П. Скулачеву возможно, что в мышце существует 2 типа митохондрий: мелкие - шарообразные, локализованные вблизи клеточных ядер и гигантские - протянутые через толщу мышечных волокон. В частности, предполагается следующий путь энергообеспечения актомиозинового комплекса: дыхание $\rightarrow (\Delta \bar{\mu}_{H^+})$

\rightarrow АТФ $\rightarrow (\Delta \bar{\mu}_{H^+}) \rightarrow \dots \rightarrow$ АТФ \rightarrow АТФ-аза актомиозина. При этом

главную часть пути энергия будет передаваться в форме $(\Delta \bar{\mu}_{H^+})$

вдоль сопрягающих мембран (гигантских митохондрий) и лишь на очень небольшие расстояния - в виде АТФ (на стыках гигантских митохондрий, тесно соприкасающихся концами). Мелкие же митохондрии могут использоваться для получения энергии, потребляющей при осуществлении других функций мышечной клетки.

В.А.Сакс [36] выражает сомнение в отношении высказанной В.П.Скулачевым гипотезы о транспорте энергии в клетке вдоль митохондриальной мембраны путем распространения мембранного потенциала, по крайней мере для сердца, где митохондрии присутствуют в их "классическом" виде, как ограниченные двойной мембраной

отдельные органеллы, имеющие обычную овальную форму (Hearse D.J. и др., 1978 - цит. по [36]).

По мнению В.А.Сакса [36], основное количество энергии переносится от митохондрий к местам ее использования в миофибриллах и во немитохондриальных мембранных системах молекулами креатинфосфата (КрФ) с участием разных изоферментов креатинкиназы (КФ 2.7.3.2.). В клетках сердца теплокровных содержится 4 изофермента креатинкиназы: мышечная форма (ММ), мозговая (ВВ), гибридная (МВ) и митохондриальная (КК_{мит.}). Во всех клеточных структурах, в которых происходят реакции выработки энергии (митохондрии и цитоплазма) или реакции, требующие затрат энергии (миофибриллы и клеточные мембраны), содержатся креатинкиназы.

Митохондриальная креатинкиназа локализована на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий и поэтому может взаимодействовать с субстратами из среды. В то же время креатинкиназа может использовать АТФ, синтезированный в митохондриальном матриксе в результате окислительного фосфорилирования, после транспорта его АТФ-АДФ-транслоказой через митохондриальную мембрану. Существует прямое функциональное сопряжение транслоказы и креатинкиназы в митохондриях сердца, что, как считает В.А.Сакс, обеспечивает практически полное использование митохондриального АТФ для синтеза КрФ. Отсюда следует, что в физиологических условиях, когда в клетках присутствует креатин, конечным макроэнергетическим продуктом митохондриальных реакций энергообразования является КрФ, поступающий из митохондрий в цитоплазму. В миофибриллах, на мембране саркоплазматического ретикулума и на сарколеммальной мембране креатинкиназы (их изоферменты) катализируют рефосфорилирование АДФ, тем самым поставляя энергию для сокращения и ионного транспорта.

Регуляция процессов превращения энергии в живых организмах во многих случаях осуществляется по принципу обратной связи. Ключевыми веществами подобной регуляции служат неорганический фосфат и АДФ. Концентрации этих веществ повышаются в результате процессов, связанных с расходом энергии. Их наличие стимулирует скорость как аэробного, так и анаэробного расщепления питательных веществ. Увеличение скорости дыхания или гликолиза в свою очередь вызывает уменьшение концентрации фосфата и АДФ и тем самым приводит к понижению скорости этих процессов [33]. В случае креатинфосфатного пути транспорта энергии в клетке креатинкиназная реакция прямым образом участвует в контроле митохондриального окислительного фосфорилирования, так как АДФ, образуя-

щийся одновременно с КрФ, по-видимому, без освобождения в среду направляется от креатинкиназы на транслоказу и затем в матрикс митохондрий, регулируя тем самым скорость окислительного фосфорилирования в сердечной и других мышечных клетках и занимая ключевое положение в регуляции митохондриального дыхания [36].

При анализе работ В.П.Скулачева [34] и В.А.Сакса [36] обращают на себя внимание акценты первого автора на исследования в области скелетных мышц и диафрагмы, а второго - в области сердечной мышцы, которые имеют существенные морфологические, физиологические и биохимические особенности. Так, В.П.Скулачев указывает, что сверхкрупные митохондрии, тянущиеся от прикапиллярных скоплений митохондрий в глубь мышцы, обнаружены в клетках красных волокон мышцы диафрагмы и скелетной мышцы. В свою очередь В.А.Сакс обращает внимание на то, что в клетках сердца в митохондриях сосредоточено 30-40% от общей креатинкиназной активности сердечной клетки, в цитоплазме - 40-45%; 15-20% активности (в виде ММ-изофермента) связаны с миофибриллами, мембраной саркоплазматического ретикулума и сарколеммальной мембраной. Кроме того, внутриклеточное содержание АТФ и КрФ в мышечных клетках сердца меняется незначительно; увеличение их использования при сокращениях компенсируется увеличением их синтеза в митохондриях. В быстрых белых скелетных мышцах такой сбалансированности нет; высокая активность АТФ-азы в них ведет к быстрому кратковременному сокращению с расщеплением внутриклеточных запасов КрФ для ресинтеза АТФ и накоплением лактата (более анаэробный метаболизм), после чего необходим период покоя - для окисления лактата в митохондриях и восстановления внутриклеточных запасов КрФ.

Не исключено, что противоречия между взглядами В.П.Скулачева и В.А.Сакса на пути транспорта энергии в клетках живых организмов только кажущиеся и что правомерно существование многообразия механизмов транспорта энергии в клетках.

Новые данные о необходимости большого количества энергии для проникновения АТФ через клеточные мембраны ставят под сомнение роль экзогенного АТФ, ранее широко применявшегося при хронической коронарной недостаточности как источника энергии для обеспечения сократительной способности миокарда [37].

А.Б.Четверин и А.С.Спирин [38] обращают внимание на то, что синтез белка на рибосоме полностью обеспечен энергией, запасенной в сложноэфирных связях аминоксил-тРНК (за счет гидролиза АТФ), а процесс элонгации может протекать без дополнительного

расхода энергии. Фактический же гидролиз как минимум двух молекул ГТФ на каждый цикл элонгации, сопровождающийся образованием одной связи, необходим не для процесса синтеза белка, а лишь как источник избыточной энергии, идущей для его ускорения (т.е. катализа) и обеспечения большей устойчивости к действию ингибиторов и других факторов (“все нужды рибосомы оплачены вперед”).

Система энергообеспечения клетки сложна. Ее механизмы саморегуляции обеспечивают слаженное протекание большого числа биохимических процессов, надежно защищенных от многих внешних воздействий мембранами клетки и митохондрий. Однако система энергообеспечения не является изолированной и позволяет осуществлять целенаправленные воздействия на ее работу. Они могут изменить как скорость образования макроэргических соединений в клетке и темпы их расходования, так и направленность биохимических реакций. К числу агентов, способных оказывать такие воздействия, в первую очередь относятся первичные носители энергии.

Скорость образования молекул АТФ в фототрофных одноклеточных организмах технически достаточно просто регулируется изменением интенсивности освещения, спектральным составом светового потока и режимом освещения. Модифицирующее влияние на поглощение световой энергии и ее дальнейшее использование клеткой оказывают концентрация углекислого газа, солевой состав, температура, рН окружающей среды и некоторые другие факторы. При освещении фототрофных организмов преобладающими в их энергетическом балансе являются процессы запасания энергии, а при отсутствии света происходит ее расходование, на которое может быть оказано воздействие концентрацией кислорода.

Для микроорганизмов, первичным источником энергии которых являются химические соединения, основной управляющий фактор - концентрация этих соединений. Для хемолитотрофных организмов первичным источником энергии являются неорганические соединения, для гетеротрофных организмов (грибов, простейших, подавляющего числа видов бактерий) и культивируемых клеток многоклеточных организмов, включая растения, - органические соединения.

Наиболее распространенным источником энергии (и углерода) для гетеротрофных микроорганизмов является глюкоза, которая может быть заменена фруктозой, маннозой, дисахаридами мальтозой, лактозой. Последние должны быть расщеплены до моносахаридов. Глюкоза напрямую вступает в гликолиз.

Если глюкоза потребляется анаэробными микроорганизмами, для которых гликолиз является единственным процессом, поставляющим

энергию, то из нее извлекается лишь небольшая часть заключенной в молекуле энергии. В этом случае энергетический КПД глюкозы очень низок, расход ее велик, а доля ассимилированного (пошедшего на создание биомассы) углерода глюкозы от общего ее потребления - ничтожна. Аэробные микроорганизмы расходуют энергию, заключенную в глюкозе, во много раз более экономично, в связи с чем доля ассимилированного углерода может быть на порядок выше, чем у анаэробных микроорганизмов. Для аэробных микроорганизмов важным управляющим фактором, помимо концентрации глюкозы, является степень насыщенности среды кислородом (степень аэрации). У факультативных аэробов (анаэробов) отсутствие или наличие в окружающей среде кислорода как акцептора электронов качественным образом влияет на обмен веществ. Так, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* на богатой среде в анаэробных условиях ассимилируют лишь 2% углерода глюкозы; основная доля химической энергии ее молекулы остается в конечном продукте брожения - этаноле. Эти же клетки на богатой среде, но в аэробных условиях ассимилируют в 5 раз большее количество углерода глюкозы (10%), которая подвергается полному окислению до CO_2 и H_2O . Конечным продуктом при аэробном культивировании дрожжей является биомасса. Это ингибирующее действие O_2 на анаэробный процесс известно как эффект Пастера. Еще большая доля углерода глюкозы (55%) ассимилируется на минимальной среде в аэробных условиях клетками *Aerobacter cloacae* [53]. Не следует забывать, что в присутствии высоких концентраций глюкозы имеет место торможение дыхания (эффект Кребтри).

Использование в качестве источника энергии углеводов или водорода связано с большей потребностью в кислороде, чем при углеводном питании. При хемоавтотрофном росте водородных бактерий водород является донором электронов и протонов для электронтранспортных систем. Он активируется водородными дегидрогеназами. Энергию, необходимую для роста, водородные бактерии получают посредством окислительного фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов от водорода к кислороду. Организация дыхательной цепи водородных бактерий в общих чертах подобна митохондриальной. При культивировании водородных бактерий необходимо определенное соотношение концентраций H_2 и O_2 в культуральной среде. По данным многих авторов, зависимость интенсивности дыхания от концентрации O_2 в лимитированной области описывается михаэлисовской кинетикой. В определенных концентрациях кислород токсичен. Фактов ингибирования роста избытком водорода не наблюдалось [67]. Таким образом, с помощью совместного

изменения концентраций H_2 и O_2 можно управлять мощностью потока энергии в клетках водородных бактерий, а через нее и скоростью образования биомассы.

Аналогичным способом можно регулировать мощность потока энергии в клетках, использующих иные источники химической энергии.

Помимо концентрации источников энергии, в культуральной среде существенное влияние на дыхательные процессы в клетках оказывает содержание в ней микроэлементов, входящих в состав кофакторов ферментов, которые выполняют окислительно-восстановительную функцию. Так, железо необходимо для синтеза геминных пигментов цитохромов и каталазы, ферредоксина и флавопротеидов. Медь содержится в концевой оксидазе дыхательного пути в дрожжах. Недостаток меди и железа вызывает увеличение размеров митохондрий дрожжей. Ионы никеля необходимы для Hydrogenomas, получающего энергию в процессе окисления водорода [53].

В ряде случаев возникает необходимость остановить поток энергии в клетках. Существует большое количество химических веществ, избирательно влияющих на компоненты дыхательной цепи. В частности, цианид действует как дыхательный яд: связывая железо, он блокирует функцию терминального дыхательного фермента цитохромоксидазы. Окись углерода, конкурируя со свободным кислородом за цитохромоксидазу, подавляет дыхание. Антимидин А нарушает перенос электронов по дыхательной цепи, ингибируя цитохром-с-редуктазу [43].

Монофторуксусная кислота FCN_2COOH , имитируя уксусную кислоту, включается в цикл Кребса и прерывает дыхательный цикл [68]. К числу веществ, специфически действующих на работу дыхательной цепи, относятся разобщители сопряженных процессов окисления и фосфорилирования - протонофоры. В настоящее время известно несколько десятков таких разобщителей.

Выше отмечалось, что при сопряжении окисления и фосфорилирования для синтеза АТФ используется около 50% энергии окисления, а другая половина рассеивается в виде тепла.

Однако возможно разобщение процессов окислительного фосфорилирования с повышением доли тепловой энергии и снижением доли энергии, используемой для синтеза АТФ. Это разобщение возможно за счет веществ, присоединяющих к себе протоны, в результате чего исчезает протонодвижущая сила, обуславливающая перенос протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, а следовательно, не происходит образование АТФ. Перенос же электронов от

НАДН к O_2 при этом протекает нормально с освобождением тепловой энергии.

Разобщителями сопряжения окисления и фосфорилирования являются 2,4-динитрофенол, непредельные жирные кислоты (их концентрация в мембранах повышается при действии холода, в том числе у зимоспящих животных, у млекопитающих, адаптированных к холоду, у некоторых новорожденных животных).

Разобщение окисления и фосфорилирования возможно при действии гормонов и других биологически активных веществ (например, высоких доз тироксина, нарушающих сопряжение путем угнетения АТФ-азы), при некоторых инфекционных заболеваниях.

У фототрофных организмов энергетический поток обычно тормозят с помощью гербицидов, обладающих ингибирующим действием в отношении фотосинтеза. К ингибиторам фотосинтеза относятся в первую очередь производные триазина (атразин) и замещенные мочевины (диурон, линурон и др.) [68].

Практически полная остановка обмена веществ, включая процессы образования и расходования молекул АТФ в клетках, происходит при их обезвоживании и (или) содержании при низких температурах. В этих условиях клетки находятся в состоянии анабиоза - временного обратимого прекращения жизнедеятельности, к которой они могут снова перейти при благоприятных условиях. В состоянии анабиоза одноклеточные организмы обладают высокой устойчивостью по отношению к повреждающим факторам, что приходится учитывать при обезвреживании (стерилизации) вредных организмов. С другой стороны, высокая устойчивость клеток (и их геномов) в состоянии анабиоза нашла широкое применение при длительном хранении коллекционных культур микроорганизмов, создании криобанков половых и соматических клеток с целью сохранения огромного видового разнообразия живой природы, сохранении спермы сельскохозяйственных животных при искусственном осеменении, клеток крови, костного мозга, других тканей и органов в медицине, пыльцы в растениеводстве, при производстве сухих микробных культур (дрожжей, молочнокислых заквасок, азотфиксирующих микроорганизмов и др.). Вопросы технологии введения в состояние анабиоза клеток и организмов (включая одноклеточные), а также процессы, протекающие при этом в клетках, отражены в многочисленных монографиях [69-71 и др.] и статьях.

Свет способен оказывать специфическое управляющее воздействие на энергообмен микроорганизмов, клеток растений и животных. Так, в 1966 г. Х. Греппин и С. Гуд обнаружили, что синий и красный

свет стимулируют дыхание бактерий *Pseudomonas fluorescens* [60]. Стимуляция цитохром-флавиновой системы сердца улитки *Helix* светом соответствующего спектрального состава сопровождалась увеличением частоты электрических импульсов и сокращений. У гигантских нейронов голожаберного моллюска *Aplysia*, которые содержат пигменты, имеющие дыхательную функцию, свет вызывает значительные изменения свойств мембраны и частоты импульсации. У эвглены при действии света наблюдается исчезновение АТФ у основания жгутика, которое может быть результатом торможения синтеза АТФ или повышения активности АТФ-азы. Показано влияние света на окислительное фосфорилирование и скорость движения бактерий *Rhodospirillum rubrum*. У нерастающих дрожжей под влиянием света происходит торможение синтеза цитохрома с [72].

Все клетки и одноклеточные организмы имеют свою систему энергообеспечения, свои источники энергии (свет, химические энергоносители) и свой набор полезных веществ и процессов, которые они могут дать при практическом использовании. Не исключено, что методы генетической и клеточной инженерии позволят не только повысить эффективность работы систем энергообеспечения клеток, но и "переделать" исходно гетеротрофные клетки в автотрофные, способные удовлетворять свои энергетические потребности за счет более дешевых источников энергии с помощью не свойственных им "чужих" систем энергообеспечения.

Известны спонтанные мутации генов, ответственных за синтез ферментов, прямо или косвенно связанных с энергетикой клетки. В частности, у дрожжей обнаружены мутанты, лишенные концевой оксидазы и использующие обходные дыхательные пути [53]. Бактерия *E. coli* с мутацией lac^- не способна расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода (и энергии) лактозу. В принципе возможны мутации в любом гене, кодирующем многочисленный набор ферментов гликолиза и цикла Кребса. Они могут привести как к гибели клетки, так и переводу ее на обходные пути образования макроэргических молекул.

§ 7. Поток вещества и его регуляция

Построение внутриклеточных структур, функционирование потоков информации, энергии и вещества, депонирование в клетке запасящихся веществ и последующее их использование немислимы без четко организованного перемещения в необходимых количествах исходных субстратов, промежуточных метаболитов и конечных продуктов обмена. По отношению к клеточному объему можно выделить внутриклеточный транспорт веществ, направленный внутрь клетки и из нее, а также транзитное (трансцеллюлярное) перемещение их через клетку, сочетающее в себе три вышеназванных направления (в некоторых тканях Metazoa).

Поскольку перемещения веществ имеют направленный (векторный) характер, должны существовать движущие силы и механизмы, обеспечивающие эту направленность и необходимую мощность материальных потоков. В этих вопросах еще далеко не все ясно, особенно по отношению к внутриклеточному транспорту, прежде всего осуществляемому посредством пузырьков. Наиболее изучен трансмембранный транспорт веществ через плазмалемму. В отношении избирательности различают неспецифический и специфический транспорт, в зависимости от движущих сил и механизмов перемещения веществ - пассивную и облегченную диффузию и активный транспорт, для которых построены упрощенные математические модели, отражающие зависимость скорости перемещения веществ от их концентрации.

Движущей силой пассивной диффузии является градиент концентрации вещества S . Транспорт осуществляется в направлении понижения концентрации вещества. Скорость пассивной диффузии, в соответствии с законом Фика,

$$U_d = -D \frac{d[S]}{dl} \cdot F, \quad (1.21)$$

где D - коэффициент диффузии ; $d[S]/dl$ - линейный градиент концентрации; F - площадь поверхности, через которую осуществляется диффузия (берется перпендикулярной направлению потока). Знак "минус" в правой части уравнения указывает на то, что перемещение вещества происходит против градиента концентрации (хотя в литературе, на наш взгляд некорректно, перемещением против градиента концентрации называют движение молекул в направлении повышения концентрации, то есть фактически по градиенту концентрации). Применительно к трансмембранному транспорту уравнение (1.21) может быть записано в виде

$$U_d = D \frac{[S_H] - [S_B]}{d} F, \quad (1.22)$$

где $[S_H]$ и $[S_B]$ - концентрации вещества снаружи и внутри клетки; d - толщина мембраны.

Направление диффузии в этом случае обратимо, то есть если концентрация вещества в окружающей среде по какой-либо причине окажется меньше, чем внутри клетки ($[S_H] < [S_B]$), начнется его выход из клетки, а скорость U_d станет отрицательной. При пассивной

диффузии вещества, перемещающиеся через мембрану, по-видимому, не взаимодействуют с ее специфическими компонентами. Таким путем осуществляется трансмембранный транспорт воды, неполярных и малополярных молекул газа (O_2 , H_2 , N_2), углеводов. Незаряженные полярные молекулы диффундируют также со сравнительно большой скоростью, если они достаточно малы (CO_2 , этанол, мочевины). Однако для большинства полярных и заряженных молекул, имеющих высокую степень гидратации, гидрофобный липидный бислой представляет практически непроницаемый барьер. Транспорт таких веществ осуществляется в определенных точках (зонах) мембраны с участием мембраносвязанных транспортных белков. Некоторые из них образуют в мембране каналы, по которым молекулы, имеющие соответствующие размеры и заряд, способны проходить бислой путем простой (физической) диффузии. Структура таких каналобразующих (туннельных) белков вносит некоторую избирательность в отношении химической природы транспортируемых молекул. Сама же скорость прохождения молекул через канал определяется законом Фика. Значение коэффициента диффузии D зависит как от геометрических параметров диффундирующих молекул (или частиц), так и от внешних по отношению к ним физических характеристик. В 1906 г. А. Эйнштейн вывел уравнение для коэффициента диффузии

$$D = RT/N \cdot 6\pi r \eta, \quad (1.23)$$

где R - газовая постоянная ($R=1,987$ кал/моль · град); N - число Авогадро ($N=6,023 \cdot 10^{23}$ моль $^{-1}$); T - абсолютная температура ($^{\circ}K$); η - вязкость растворителя (в пуазах; 1 пуаз=1 кг/(м·с)); r - радиус диффундирующих молекул (или частиц), условно представленных в виде шариков (6π является своего рода коэффициентом формы для сферической частицы; для частиц иной формы вместо 6π должно стоять иное выражение). Уравнения (1.21 - 1.23) содержат ряд пара-

метров, с помощью которых можно целенаправленно воздействовать на скорость пассивной диффузии (управлять ею).

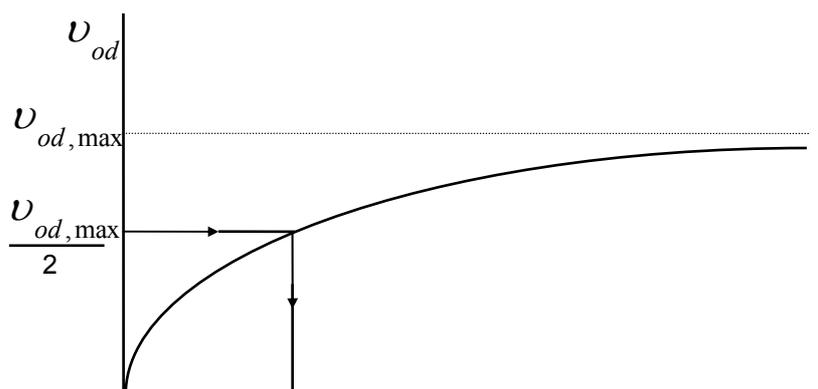
Кроме каналобразующих белков, с мембраной связаны белки-переносчики (пермеазы), осуществляющие облегченную диффузию - перенос определенных молекул в направлении понижения их концентрации (подобно пассивной диффузии). Белки-переносчики специфически связывают и транспортируют растворенные молекулы через липидный бислой [39]. Скорость переноса вещества через единицу поверхности мембраны ($F=1$) в случае облегченной диффузии

$$U_{od} = U_{od,max} \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (1.24)$$

где $U_{od,max}$ - максимальная скорость диффузии при насыщающих концентрациях вещества S с одной стороны мембраны и отсутствии его с другой стороны; K_m - константа связывания, численно равная концентрации вещества S, при которой $U_{od} = 0,5 U_{od,max}$.

Кинетически уравнение (1.24) напоминает уравнение Михаэлиса-Ментен. Ему соответствует кривая насыщения (рис. 1.9).

Кинетическое сходство с ферментом увеличивает и способность некоторых веществ конкурентно и неконкурентно ингибировать работу белка-переносчика. Отличие заключается в том, что молекула транспортируемого вещества обычно не претерпевает ковалентной модификации при взаимодействии с белком-переносчиком.



иона часто выступает протон (H^+), который осуществляет симпорт лактозы, глюкозы и антипорт другого иона (Na^+ или аниона органической кислоты). Кинетика активного транспорта сходна с михаэлисовской, графически зависимость скорости транспорта от концентрации лимитирующего вещества выражается в виде кривой с насыщением. Лимитирующими факторами, кроме концентрации транспортируемых веществ, могут быть концентрации АТФ или значения трансмембранного электрохимического градиента.

Поскольку количество переносимого через мембрану вещества прямо пропорционально площади плазмалеммы, последняя у эпителиальных клеток на апикальной стороне несет большое количество микроворсинок, которые могут увеличить общую площадь клеточной поверхности в десятки раз.

Существует еще ряд других механизмов трансмембранного переноса веществ, однако и для них лимитирующими факторами остаются те же, что рассмотрены выше. Сходными являются и механизмы транспорта метаболитов через внутриклеточные мембраны. Ядерный транспорт осуществляется через ядерные поры, которые пронизывают ядерную оболочку всех эукариотических клеток. Поры окружены большими кольцевыми структурами белковой природы, которые называются ядерными поровыми комплексами.

Все виды трансмембранного транспорта, обслуживая сложные метаболические процессы в клетке, естественно, находятся под строгим контролем ее систем регуляции. Одним из способов регуляции скорости пассивной диффузии является изменение площади клеточной поверхности за счет фибриллярных выростов (микроворсинок, филоподий), которые отчетливо выявляются с помощью растровой электронной микроскопии [40]. Изменение площади поверхности позволяет в широком диапазоне регулировать скорость диффузии. Не менее эффективной является регуляция с помощью градиента концентраций субстрата (их разности по обе стороны плазмалеммы, (1.22)). Многие одноклеточные организмы обладают хемотаксисом. Перемещаясь по градиенту концентрации субстрата, они находят участок, где ее значение максимально. Концентрация субстрата внутри клетки зависит от скорости его превращения: чем быстрее молекула субстрата расходуется (или химически видоизменяется), тем больше градиент концентрации, и наоборот. Разница концентраций $[S_H] - [S_B]$ выполняет роль обратной связи, которая регулирует скорость пассивной диффузии. Эта разность может принимать не только нулевое (транспорт прекращен), но и отрицательное значение (субстрат выводится из клетки). Уравнение (1.23) ука-

зывает еще на один способ регуляции скорости пассивной диффузии - с помощью температуры. С повышением температуры скорости ферментативных реакций повышаются, и синхронно с ними увеличивается скорость поступления субстрата в клетку за счет роста значения коэффициента диффузии D . Последнее обстоятельство обусловлено увеличением кинетической энергии молекул субстрата (T - в числителе) и уменьшением вязкости растворителя (η - в знаменателе). В случае пассивной диффузии через каналы, сформированные каналобразующими белками, ее максимальная скорость может регулироваться плотностью расположения каналов на плазмалемме, что связано, в конечном счете, со скоростью биосинтеза каналобразующих белков. Таким образом, регуляция скорости диффузии оказывается связанной с биосинтезом белка, в простейшем случае по рассмотренной ранее схеме с репрессией транскрипции мРНК каналобразующего белка транспортируемым субстратом или образующимся из него метаболитом.

Скорость облегченной диффузии также регулируется разностью концентраций субстрата по обе стороны плазмалеммы и количеством молекул белка-переносчика на плазмалемме.

В случае активного транспорта, протекающего с затратой энергии молекул АТФ (прямо и / или косвенно через трансмембранный электрохимический градиент), скорость переноса веществ через мембрану может регулироваться концентрацией АТФ. Поскольку роль белка-переносчика в активном транспорте выполняют ферменты, их каталитическая активность, как и в метаболических системах, регулируется с помощью специфически действующих ингибиторов и активаторов, а также самих переносимых веществ (цис- и трансингибирование, цис- и трансстимуляция).

Аналогичные механизмы регуляции имеют место в случае секреции белков, содержащих на аминоконцевом участке сигнальный (лидерный) пептид, который способствует прохождению белковой молекулы через двойной липидный слой плазматической мембраны. Когда этот белок оказывается частично или полностью экспортированным через мембрану, специфическая протеаза (сигнальная пептидаза) удаляет сигнальный пептид [41].

Экзоцитоз и эндоцитоз являются энергозависимыми процессами. Кроме того, при этом расходуются участки плазмалеммы, восполнение которой связано с работой ферментов и затратой энергии. Поэтому данный вид транспорта также регулируется путем воздействия на работу ферментов и их биосинтез.

Сходным образом обстоит дело и с регуляцией работы локализо-

ванных на мембране систем транслокации (или переноса) групп. Эти транспортные системы переводят субстрат в химическую форму (например, путем его фосфорилирования), не способную проходить через мембрану наружу, следствием чего является накопление таких веществ в клетке, в частности, фосфорилированных сахаров в бактериях.

Транспортные мембранные белки относятся к числу интегральных белков. Их гидрофобные аминокислотные остатки располагаются на поверхности молекулы белка и взаимодействуют с углеводородными цепями полярных липидов. Для сохранения функциональной активности этих белков необходимо гидрофобное окружение липидов мембран. Вещества, изменяющие структуру липидного бислоя, косвенно воздействуют на функциональные свойства интегральных белков. Примером регулирующего действия липидов на функциональную активность белков являются эффекты, вызванные использованием локальных анестетиков, которые нарушают структуру липидного би-слоя. При уменьшении концентрации анестетиков восстанавливается структура бислоя, а с ней и функция натриевых каналов в нейрональной ткани [42].

Клетки не только потребляют субстраты и выделяют рекреты, экскреты и секреты. Они во многих случаях депонируют (накапливают) разнообразные вещества. Бактерии запасают липиды, полисахариды, полифосфаты, серу; клетки растений - крахмал, липиды, белки; животные клетки - гликоген, жиры. Транспорт исходных веществ, перевод их в пригодное для депонирования состояние, использование запасных веществ связаны с работой многочисленных ферментов. Поэтому регуляция данных процессов осуществляется также путем воздействия на работу ферментов и их биосинтез.

ГЛАВА ВТОРАЯ

УПРАВЛЕНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ

§ 1. Систематическое положение одноклеточных организмов

Одноклеточные организмы (клетки - организмы) исторически явились предшественниками многоклеточных, которые образовали растительное и животное царства. Тем не менее, в обоих царствах сохранились одноклеточные формы, которые Э.Геккель (1866) предложил отнести к третьему царству, занимающему промежуточное положение между растениями и животными (в настоящее время существуют классификации, разделяющие живые организмы на большее число царств, однако это не сказывается на сути рассматриваемого вопроса). Его представителей он назвал протистами (по гречески - "самый простой"). Одноклеточные растительные и животные организмы имеют характерное строение, важнейшей особенностью которого является наличие ядра, отграниченного от цитоплазмы оболочкой. За эту особенность их отнесли к эукариотам (высшим протистам). Остальные одноклеточные формы, не имеющие оформленного ядра, были отнесены к прокариотам (низшим протистам) [43]. Их можно рассматривать как реликтовые формы, сохранившиеся с самых ранних времен биологической эволюции. Прокариоты морфологически слабо дифференцированы. Однако с их морфологическим однообразием удивительно контрастируют чрезвычайно многообразие и пластичность метаболических процессов [43], позволившие прокариотам занять обширнейшую по трофическим возможностям экологическую нишу.

Таким образом, к одноклеточным протистам относятся наряду с бесспорными объектами микробиологии (бактерии), ботаники (одноклеточные эукариотические водоросли), зоологии (простейшие), такие организмы, которые считают "своими" как микробиологи, так и ботаники (цианобактерии, до недавнего времени именуемые сине-зелеными водорослями, грибы).

§ 2. Структурные и функциональные особенности одноклеточных организмов

Филогенетическое и систематическое родство одноклеточных организмов с представителями всех трех царств живого обусловило их большое структурно-функциональное разнообразие.

Среди одноклеточных организмов, на которые издавна человек оказывает целенаправленные воздействия, следует в первую очередь назвать прокариоты. Помимо отсутствия ядерной оболочки, о чем говорилось выше, прокариотические (прокариотные) клетки имеют ряд других особенностей: нуклеоид (аналог ядра эукариотической клетки) состоит из одной (кольцевой) хромосомы, отсутствуют типичные для эукариот цитоплазматические структуры (митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и др.), движение цитоплазмы, митоз. Рибосомы прокариот обычно по размеру несколько меньше, чем цитоплазматические рибосомы эукариот [43]. Прокариоты - гаплоидные организмы. Подавляющее большинство бактерий имеет линейные размеры на порядок меньше, чем у эукариот. Следовательно, по объему, массе (а во многих случаях и по содержанию ДНК) они приблизительно на три порядка уступают эукариотическим клеткам. С другой стороны, отношение поверхности клетки к ее объему у них в среднем на порядок больше, что способствует быстрому проникновению субстратов внутрь прокариотических организмов и оттоку продуктов обмена в окружающее пространство. Благодаря этому соответственно повышается интенсивность метаболизма. Следует отметить, что по строению и химическому составу клеточная стенка прокариот резко отличается от таковой эукариотических организмов. На ее долю приходится от 5 до 50% сухих веществ клетки. Химический состав и строение клеточной стенки является одним из систематических признаков бактерий (грамположительные и грамотрицательные виды). Снаружи клеточная стенка прокариот часто бывает окружена слизистыми веществами, образующими капсулы, слизистые слои или чехлы [44].

Поскольку у прокариот ДНК, локализованная в определенном участке клетки, не отделена от цитоплазмы ядерной оболочкой, пространственно не разделенными оказываются и процессы транскрипции и трансляции. Более того, они не разделены и во времени. Транскрипция и белковый синтез протекают почти одновременно: 3' - конец мРНК еще синтезируется, а 5' - конец ее уже транслируется рибосомами. То же можно сказать и о процессах репликации ДНК и

транскрипции, которые протекают одновременно. Все эти процессы (репликация, транскрипция и трансляция) осуществляются параллельно и не мешают друг другу. Любопытно, что имеет место даже своеобразное временное несоответствие между процессами деления клетки и репликацией ДНК. Так, удвоение хромосомы у *E. coli* занимает примерно 40 минут. При благоприятных условиях *E. coli* делится через 20 минут. Временной парадокс объясняется тем, что обе дочерние хромосомы начинают новый цикл репликации до того, как закончится их собственный и произойдет деление клетки [43]. Все это свидетельствует об отсутствии у прокариот четкой пространственно-временной дифференцировки жизненного цикла, свойственной эукариотическим клеткам. В плане управления работой прокариот отмеченная особенность их функционирования почти полностью исключает избирательность воздействия на какой-либо период жизненного цикла, даже для синхронно делящихся клеток, что опять же резко отличает их от одноклеточных эукариот.

Малые размеры прокариот вынуждают их процесс пищеварения (расщепления крупных молекул субстрата) осуществлять за пределами клетки с помощью выделяемых наружу гидролитических ферментов (экзоферментов). Некоторые из них синтезируются только тогда, когда соответствующее вещество находится вблизи клетки. Такие индуцибельные ферменты могут составлять до 10% общего белка, содержащегося в клетке. Это свидетельствует о четкой работе регуляторных механизмов у прокариот [43].

По типу питания прокариоты разделяют в зависимости от происхождения клеточного углерода на автотрофные и гетеротрофные организмы. Автотрофные организмы получают весь или почти весь углерод путем фиксации углекислого газа, гетеротрофные организмы получают его в основном из органических соединений. В зависимости от химической природы окисляемого субстрата прокариоты разделяют на органотрофные и литотрофные. Первые используют органические субстраты, вторые - неорганические. В зависимости от механизма преобразования энергии в доступную для клетки форму (АТФ) различают фототрофные (использующие свет) и хемотрофные (использующие энергию окислительно-восстановительных реакций, протекающих с участием питательных субстратов) организмы [43]. По способу питания (поступления питательных веществ в клетку) прокариоты подобно растениям и грибам относятся к голофитным организмам, то есть получающим растворенные субстраты посредством транспорта через поверхностные структуры клетки [48].

Вынужденные к существованию в экстремальных условиях изме-

няющейся внешней среды прокариоты приспособились переносить такие диапазоны воздействий, которые оказываются губительными для эукариотических организмов. Многие бактерии не теряют жизнеспособность при высушивании, охлаждении до температур, близких к абсолютному нулю. Термофильные бактерии могут развиваться при температуре до 105° [43], а споры бацилл и клостридий достаточно длительное время выдерживают температуру существенно выше 100°. Кислотоустойчивые бактерии остаются жизнеспособными при кислотности среды, доходящей до pH 1. В то же время другие бактерии могут одинаково хорошо развиваться в интервале pH от 4,4 до 9. Отдельные виды бактерий способны расти в насыщенных растворах поваренной соли. Многие бактерии могут переносить давление до нескольких тысяч атмосфер (3000 атм) [45]. Тионовые бактерии, обитающие в залежах урановых руд, обладают устойчивостью к радиоактивным излучениям [46]. Бактерии находили в воде атомных реакторов, где они подвергались облучению с суточной дозой в несколько миллионов рад. Существуют бактерии, способные утилизировать такие токсичные соединения, как бензол, толуол, ксилол, гербициды, инсектициды, сероводород и др. Различаются они и по отношению к свету, наличию кислорода в окружающей среде (облигатные аэробы и анаэробы, факультативные анаэробы), по способности использовать минеральные или органические субстраты и другим показателям. Все это свидетельствует о больших возможностях управления функционированием прокариот с помощью различных физических и химических воздействий.

Одноклеточные эукариотические организмы, в отличие от прокариот, имеют многокомпартментное строение и, как правило, полный набор присущих эукариотическим клеткам органоидов. К одноклеточным представителям растительного царства относятся водоросли и грибы. Водоросли - преимущественно автотрофные фотосинтезирующие организмы, содержащие специализированные органеллы - хроматофоры (хлоропласты) и живущие, как правило, в воде и почве. Хроматофоры содержат хлорофилл и другие пигменты. В качестве примера можно назвать некоторых представителей одноклеточных эукариотических водорослей (родовые названия): перидиниум, церациум (тип пиррофитовые водоросли), эвглена, факус, трахеломонас (тип эвгленовые водоросли), хламидомонада, дуналиелла, хлорококк, хлорелла, кластериум, космариум, зуаструм, спиротения, цилиндростис (тип зеленые водоросли), пиннулярия, навикула, цимбелла, гиросигма, плевросигма, циклотелла и др. (тип диатомовые водоросли) [47]. Во многих случаях одноклеточные организмы объе-

диняются в колонии. Наряду с автотрофным у некоторых водорослей имеет место гетеротрофное питание. В частности, отдельные виды рода эвгленовых, которых зоологи относят к типу саркомастигофоры (саркожгутиконосцы), в темноте легко обесцвечиваются и переходят от аутотрофного обмена к сапрофитному гетеротрофному. Этот переход обратим, то есть они способны к смешанному (миксотрофному) питанию.

Грибы - низшие эукариоты, сочетающие признаки как растений (неподвижность, неограниченный верхушечный рост, способность к синтезу витаминов, наличие клеточных стенок), так и животных (гетеротрофный тип питания, наличие хитина в клеточных стенках, запасных углеводов в форме гликогена, образование мочевины, структура цитохромов) [48]. Среди них имеются как одноклеточные (часто микроскопические), так и многоклеточные организмы. Вегетативное тело (мицелий) состоит из системы ветвящихся нитей (гиф), которые развиваются на поверхности или внутри субстрата. Большая поверхность соприкосновения гиф с субстратом обеспечивает осмотическое поглощение питательных веществ. Грибы лишены хлорофилла и развиваются как сапрофиты (в почве, на растительных остатках и других субстратах) или как паразиты (преимущественно на живых растениях). К одноклеточным грибам относятся представители классов архимицеты, фикомицеты (низшие грибы). В классе сумчатые (высшие) грибы есть безмицеллярные формы, существующие в виде отдельных, большей частью овальных клеток, размножающихся почкованием (род сахаромицес). Два вида этого рода (пивные, или хлебные, и винные дрожжи) имеют большое практическое значение. Они могут развиваться как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Одноклеточные животные (простейшие) в подавляющем большинстве представлены организмами микроскопически малых размеров. Общее число известных видов превышает 30000. Простейшие содержат все присущие эукариотам органоиды. В прогрессивной эволюции некоторых групп простейших (радиолярий, инфузорий) происходило многократное увеличение хромосомных наборов (полиплоидизация). Другим своеобразным путем изменения ядер у простейших (инфузорий, некоторых фораминифер и микроспоридий) является дифференцировка их на генеративные (микронуклеусы) и вегетативные (макронуклеусы) [49]. Представляет интерес динамика формирования макронуклеуса после конъюгации у брюхожесничных инфузорий. В формирующемся макронуклеусе происходит значительное увеличение количества ДНК, после чего следует резкая ре-

дукция генетического материала (до 93%). Оставшаяся ДНК, небольшая по общему количеству, но содержащая всю необходимую для функционирования макронуклеуса информацию, многократно реплицируется. В результате создается дефинитивный макронуклеус, в котором отсутствует подавляющая часть нефункционирующих генов, в то время как функционирующие локусы представлены значительным количеством копий [50]. Простейшие - гетеротрофные организмы с внутриклеточным пищеварением. Пища внутрь клетки поступает путем фагоцитоза или пиноцитоза. Среди простейших широко распространен паразитизм, вызывающий тяжелые заболевания человека и животных. Некоторые виды паразитируют в растениях. Почвенные простейшие (корненожки, жгутиковые и ресничные инфузории), поедая бактерии, поддерживают их в физиологически активном состоянии и тем самым оказывают положительное влияние на быстроту минерализации ими органических остатков [45]. Важную роль простейшие выполняют в процессе биологической очистки воды на очистных сооружениях. Питаясь бактериями, простейшие регулируют их численность в активном иле. Наряду с сапрофитными бактериями они поедают и патогенные микроорганизмы, выполняя тем самым санитарную функцию. Важнейшая функция простейших - осветление воды. Пропуская через свой организм тонкие взвешенные в воде частицы, инфузории склеивают их и выбрасывают обратно в воду в виде сравнительно крупных, легко оседающих компактных комочков [51].

Колоссальное разнообразие представителей протистов открывает большие возможности в их практическом использовании, которое в качестве важнейшего элемента включает управление работой этих организмов. Оно предполагает строгий учет всех особенностей, прежде всего функциональных, присущих конкретному объекту управления (виду или даже штамму протиста). Во всех приведенных примерах, связанных с проблемами медицины, ветеринарии, сельского хозяйства, экологии, просматривается необходимость целенаправленного воздействия на работу простейших - участников этих сложных биологических процессов.

§ 3. Практические задачи управления микроорганизмами

Каждый уровень биосистем в плане практического их использования имеет свои возможности, достоинства и недостатки. Применение отдельных ферментов позволяет избирательно и эффективно осу-

ществлять одиночные химические реакции. Для ускорения цепочки взаимосвязанных реакций требуется несколько различных ферментов, при этом возникает необходимость организовать длительную, согласованную работу их в оптимальных для каждого фермента условиях. При решении таких задач человек сталкивается с проблемами, которые давно решены Природой на клеточном уровне. Более того, она попутно решила и вопрос с воспроизводством ферментов, заменой “износившихся” молекул на новые. Однако эволюция, создавая одноклеточные организмы, руководствовалась своими критериями и не преследовала цели удовлетворения разнообразных потребностей еще не появившегося в то время вида *Homo sapiens*. Поэтому не все, что могут дать микроорганизмы, нужно людям, и не все, что требуют от них люди, необходимо самим микроорганизмам. Отсюда возникают различные взаимодополняющие стратегии в отношении практического использования микроорганизмов. Во-первых, необходимо в каждом конкретном случае осуществлять целенаправленный “перекос” метаболизма микроорганизмов в сторону увеличения доли нужного продукта. Для этого имеется целый арсенал способов. Во-вторых, нужно полнее, желательнее комплексно использовать все, что получает человек, выращивая микроорганизмы. В-третьих, необходимо создавать штаммы микроорганизмов, не встречающихся в природе и ориентированных на выполнение конкретных потребностей человека.

Каждый уровень биосистем и каждая группа представителей внутри этого уровня способны решать свой круг задач в плане удовлетворения практических потребностей человека, занимают в них свою “экологическую нишу”. В целом же культивирование микроорганизмов дает следующие конечные результаты:

1. Позволяет получать биомассу или отдельные внутриклеточные компоненты: микробный белок, эндоферменты и даже такие экзотические запасные вещества, как жидкие углеводороды, пластмассы (пуллулан, полигидроксibuтират и др. [52]).

2. Дает возможность периодически или непрерывно отбирать из реакционного объема (культиватора) продукты жизнедеятельности микроорганизмов, выделяемые ими за пределы клетки: разнообразные метаболиты, экзоферменты, антибиотики и др.

3. Позволяет осуществлять с участием ферментных систем микроорганизмов модификацию отдельных химических веществ, превращая их в более ценные продукты (получать АТФ путем фосфорилирования аденозина, аспаргиновую кислоту путем аминирования фумарата и т.д.). При этом не происходит синтез конечного продукта

de novo.

4. Очищает воду от промышленных и коммунальных загрязнений. Конечными продуктами являются чистая вода и активный ил, который при определенных условиях может быть использован в сельском хозяйстве.

5. Позволяет извлекать полезные вещества, прежде всего металлы, из пород с низким их содержанием.

6. Является важным этапом в получении различных вакцин (живых, убитых корпускулярных и химических вакцин, анатоксинов).

7. Является источником микробиологических удобрений и средств защиты растений от их вредителей.

Существуют и некоторые другие специфические результаты, которые дает людям использование микроорганизмов.

В рамках названных направлений существуют сходные подходы практической реализации конкретных технологий.

§ 4. Факторы, определяющие продуктивность микроорганизмов

При кажущемся многообразии конечных результатов культивирования микроорганизмов в принципе все сводится к двум вариантам исходов. В одном из них получают биомассу или определенную часть ее, в другом - измененную окружающую среду.

В нормальных условиях практически весь источник углерода превращается в биомассу и в конечные продукты энергетического метаболизма, при этом метаболиты, получение которых часто является целью микробиологического производства, образуются в минимальных количествах. С. Дж. Перт [53] подразделяет продукты ферментации на ряд классов: конечные продукты энергетического метаболизма (этанол, метан и др.), энергетические запасные соединения (гликоген), внеклеточные и внутриклеточные ферменты, структурные компоненты клетки (белки одноклеточных, антигены и др.), промежуточные метаболиты (витамин В₁₂, лимонная кислота и др.), вторичные метаболиты (антибиотики, гиббереллины и др.), трансформированные субстраты (например, стероиды), вирусы. Чтобы получить в достаточном количестве нужный продукт, необходимо осуществить соответствующую настройку системы метаболической регуляции на образование микроорганизмом этого продукта. Для количественной оценки скорости нарастания биомассы и эффективности воздействия на этот процесс различных факторов построены математические модели, которые могут быть использованы и для продуктов, прямо

или косвенно связанных с синтезом биомассы, так как их количество прямо пропорционально образованной биомассе. Для иных классов продуктов, например вторичных метаболитов, необходимы свои способы управления скоростью их образования.

На скорость синтеза биомассы существенное влияние оказывают концентрация компонентов питательной среды (субстратов), концентрация кислорода (для аэробных процессов), температура, pH среды, концентрация метаболитов (продуктов обмена) в культуральной среде, интенсивность ее перемешивания, давление газа (если он используется в качестве субстрата), наличие ингибиторов биосинтеза, генетические особенности штамма микроорганизма, естественно концентрация самой биомассы в ферментаторе, способ культивирования (периодическое, проточное, глубинное, поверхностное) и т.д.

Скорость образования биомассы в каждом конкретном случае может лимитироваться скоростью ферментативной реакции или скоростью поступления субстрата в клетку. В первом случае говорят о культивировании в кинетической области, во втором - в диффузионной. В основе каждого из этих видов лимитирования лежат свои механизмы, в соответствии с которыми разрабатываются наиболее эффективные способы управления скоростью биосинтеза.

§ 5. Управление скоростью образования биомассы субстратом

В основе жизнедеятельности микроорганизмов лежат совокупности взаимосвязанных ферментативных реакций, протекающих в клеточном объеме. Конкретный вид микроорганизмов требует наличия в питательной среде различных компонентов, взятых в определенных соотношениях. Если среди этих компонентов, взятых в избыточных (насыщающих) концентрациях, имеется один с низкой концентрацией, то он будет ограничивать скорость роста. Его называют лимитирующим субстратом. Повышая или понижая концентрацию лимитирующего субстрата можно управлять скоростью образования биомассы. Поскольку синтез биомассы осуществляется с участием ферментов, то можно предположить, что уравнение, описывающее зависимость скорости этого синтеза от концентрации лимитирующего субстрата, должно по сути своей напоминать уравнение Михаэлиса-Ментен, известное из кинетики ферментативных реакций. Действительно, в 1942 г. Моно эмпирически подтвердил это предположение. Уравнение Моно

$$\mu = \mu_{\max}[S]/(K_S + [S]) \quad (2.1)$$

выражает гиперболическую зависимость удельной скорости роста биомассы ($\mu = d[X]/[X]dt$, $[X]$ - концентрация биомассы) от концентрации лимитирующего субстрата S. Величина K_S называется константой насыщения; максимальное значение удельной скорости роста μ_{\max} имеет место при насыщающей концентрации лимитирующего субстрата ($[S] \gg K_S$).

Уравнение Моно выведено для популяции микроорганизмов (суммативной системы). Учитывая слабо выраженную периодичность в жизненном цикле микроорганизмов и "разновозрастный" состав их популяции, применительно к отдельной клетке можно вести речь о среднем значении удельной скорости роста μ . Сопоставляя между собой непрерывную и дискретную модели роста микробной популяции

$$[X] = [X_0] e^{\mu t} \quad (2.2)$$

$$[X] = [X_0] 2^{\{t/g\}}, \quad (2.3)$$

при постоянной концентрации лимитирующего субстрата) можно сказать, что в момент t, кратный времени удвоения численности популяции ($\{t/g\}$) происходит увеличение исходной концентрации биомассы $[X_0]$ в $e^{\mu t}$ и одновременно в $2^{\{t/g\}}$ раз.

Из равенства

$$e^{\mu t} = 2^{\{t/g\}}$$

следует соотношение между средними значениями удельной скорости роста μ и времени удвоения численности популяции g (времени генерации, продолжительности жизненного цикла клетки)

$$\mu \cdot g = 0,693, \quad (2.4)$$

откуда $g = 0,693 / \mu$.

Поскольку время между двумя последовательными делениями клетки g является показателем не суммативной системы, а отдельной клетки, уравнение Моно (2.1) можно записать в виде

$$g = g_{\min} \left(\frac{K_S}{[S]} + 1 \right), \quad (2.5)$$

где $g_{\min} = 1 / \mu_{\max}$.

Графически зависимость продолжительности жизненного цикла g от концентрации субстрата выражается гиперболой (рис. 2.1а). В осях $g-1/[S]$ эта зависимость становится прямолинейной (рис. 2.1б).

Из уравнения (2.5) следует, что константа насыщения K_S численно равна концентрации субстрата, при которой продолжительность жизненного цикла клетки в 2 раза превышает минимальное значение (g_{\min}).

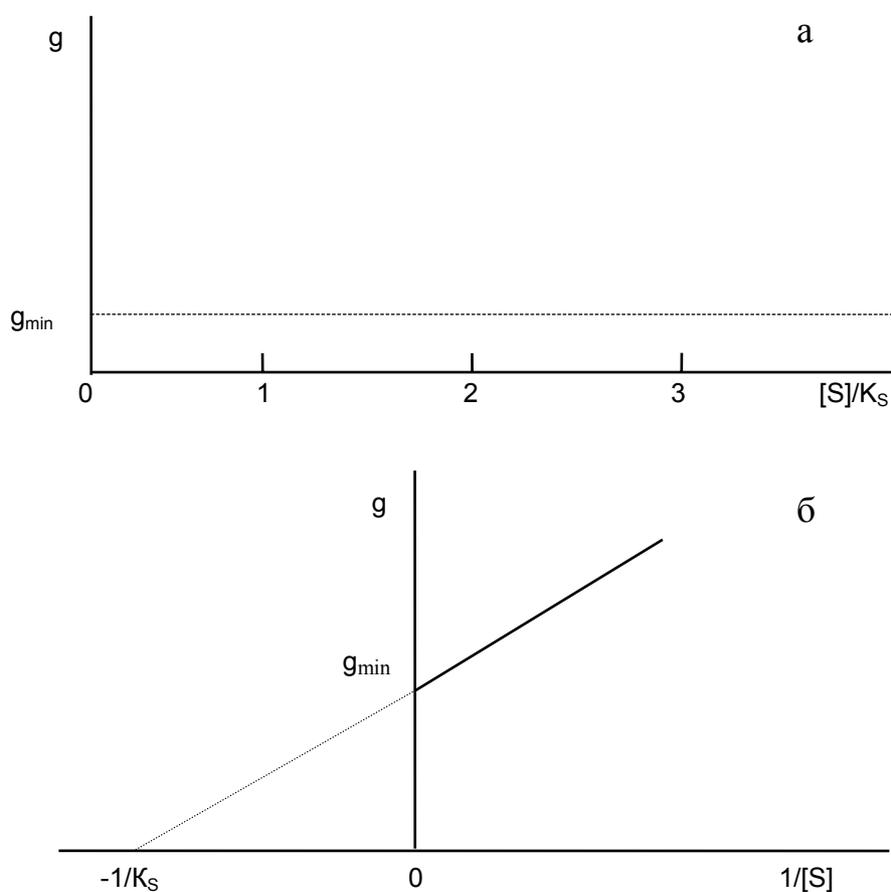


Рис.2.1. Зависимость продолжительности жизненного цикла микроорганизма от концентрации лимитирующего субстрата, выраженной: а) в единицах K_S ($[S]/K_S$), б) в обратных единицах ($1/[S]$)

Некоторые субстраты (спирты, фенолы, углеводороды), взятые в избытке, ведут себя как ингибиторы роста [53]. Значение удельной скорости роста в случае субстратного ингибирования вначале увеличивается с повышением концентрации субстрата, а затем начинает снижаться, подобно тому, как это происходит с субстратным торможением ферментативной реакции.

Аналитически зависимость μ от концентрации лимитирующего субстрата, обладающего способностью тормозить рост, выражается уравнением, предложенным Эндрюсом [54]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_S + [S] + [S]^2 / K_i}, \quad (2.6)$$

где K_i - константа ингибирования, которая часто значительно больше константы насыщения ($K_i \gg K_S$).

Концентрация субстрата, при которой удельная скорость роста достигает максимального значения,

$$[S_{\text{opt}}] = \sqrt{K_S \cdot K_i}. \quad (2.7)$$

Зависимость продолжительности жизненного цикла клеток g от концентрации субстрата в осях $g-1/[S]$ выражается графиком, подобным случаю с субстратным торможением ферментативной реакции (рис. 2.2). Субстратное ингибирование увеличивает продолжительность жизненного цикла клетки ($g_{\text{min,u}} > g_{\text{min}}$).

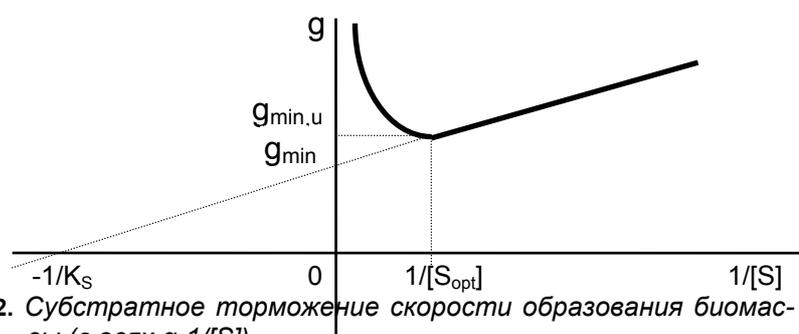


Рис. 2.2. Субстратное торможение скорости образования биомассы (в осях $g-1/[S]$)

Кинетика усложненных механизмов субстратного ингибирования рассмотрена в работе [55].

Возможны случаи, когда в питательной среде содержится не один лимитирующий (с ненасыщающей концентрацией) субстрат, а два

(или более). Для двух лимитирующих субстратов А и В удельная скорость роста

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[A]}{K_A + [A]} \cdot \frac{[B]}{K_B + [B]} = \mu_{\max} \frac{[A][B]}{(K_A + [A]) \cdot (K_B + [B])}, \quad (2.8)$$

где K_A и K_B - константы насыщения для субстратов А и В [56]. Из этого уравнения может быть найдено значение продолжительности жизненного цикла клетки по формуле $g=0,693/\mu$, или

$$g = g_{\min} \left(\frac{K_A}{[A]} + 1 \right) \cdot \left(\frac{K_B}{[B]} + 1 \right), \quad (2.9)$$

где $g_{\min} = 1/\mu_{\max}$.

Применительно к суммативной системе (популяции микроорганизмов) скорость образования биомассы

$$d[X]/dt = \mu [X], \quad (2.10)$$

а прямо или косвенно связанного с ней продукта Р, составляющего определенную долю q_P от биомассы,

$$d[P]/dt = q_P d[X]/dt = q_P \mu [X]. \quad (2.11)$$

При этом время удвоения концентрации продукта, как и для биомассы в целом, равно g .

Приведенные уравнения, отражающие зависимость скорости нарастания биомассы, выраженной через показатели μ или g , от концентрации субстрата, справедливы для культивирования микроорганизмов в кинетической области и частично в диффузионной, если лимитирующими процессами поступления субстратов в клетку будут активный транспорт или облегченная диффузия, кинетика которых сходна с михаэлисовской (см. ниже).

Влияя на скорость образования биомассы в целом, концентрация лимитирующего субстрата не в полной мере определяет ее качественный состав. Химический состав клетки и экстрацеллюлярных продуктов в большой мере зависит от состава культуральной среды, прежде всего в отношении источников углерода и азота. Поддерживая определенные условия культивирования, можно управлять ходом ферментационного процесса, получать биомассу заданного состава (разумеется, в пределах потенциальных возможностей клетки) [57]. Это, в частности, было показано работами по выращиванию дрожжей на разных средах. При этом качественный и количественный состав интра- и экстрацеллюлярных белков, липидов, полисахаридов

ридов, полиолов, витаминов обнаружил существенную зависимость от состава среды, на которой выращивались дрожжи. В частности, при использовании в качестве источника углерода смеси n-алканов в клетке будет происходить преимущественно синтез тех жирных кислот, которые наиболее легко могут образовываться из преобладающей группы углеводов. n-Алканы способны ассоциироваться с различными липидами и накапливаться в клетке в виде так называемых биоллипидов, содержащих до 45-55% углеводов [57].

Состав питательной среды влияет не только на состав синтезируемых белков, жирнокислотный состав липидов, моносахаридный состав полисахаридов и т.д., но и на количественное соотношение в содержании этих групп соединений (белков, липидов, углеводов, полиолов) [57].

§ 6. Ингибирование роста микроорганизмов продуктами их жизнедеятельности

При управлении ростом микроорганизмов необходимо учитывать возможное ингибирующее действие продуктов их жизнедеятельности, выделяемых в окружающую среду. К числу таких продуктов-ингибиторов, в частности, относятся органические кислоты, антибиотики, этанол, которые при высоких концентрациях могут вызвать полную остановку роста микроорганизмов. Подобно уравнению Эндрюса, влияние продуктов жизнедеятельности микроорганизмов на их рост описывается с позиций ферментативной кинетики. Так, исходя из предположения о неконкурентном действии собственного продукта Р микроорганизма на активность фермента, определяющего "узкое место" клеточного метаболизма, Н.Д. Иерусалимский для микробной популяции предложил уравнение

$$\mu = \mu_{\max} \frac{K_p}{K_p + [P]}, \quad (2.12)$$

где [P] - концентрация продукта; K_p - константа ингибирования, численно равная концентрации продукта, при которой скорость роста достигает половины максимальной.

На основании уравнений (2.4) и (2.12) продолжительность жизненного цикла клетки

$$g = g_{\min}(1 + [P]/K_p). \quad (2.13)$$

Это уравнение отражает прямолинейную зависимость продолжительности жизненного цикла от концентрации продукта (рис. 2.3).

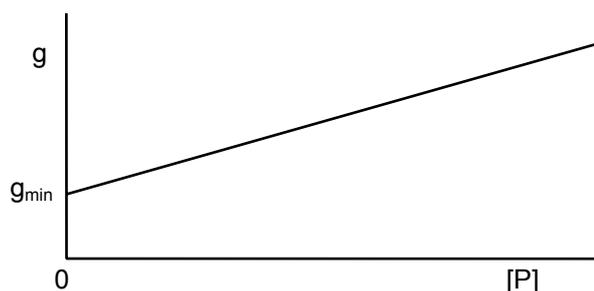


Рис. 2.3. Зависимость продолжительности жизненного цикла микроорганизма от концентрации выделяемого им продукта P

В случае периодического культивирования микроорганизмов в культуральной среде с течением времени происходит одновременное уменьшение концентрации субстрата и увеличение концентрации продуктов их жизнедеятельности. Если один из этих продуктов (P) оказывает ингибирующее влияние на рост численности популяции, для нахождения удельной скорости роста может быть использовано уравнение Моно-Иерусалимского:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \cdot \frac{K_p}{K_p + [P]}, \quad (2.14)$$

которое объединяет уравнения Моно (2.1) и Иерусалимского (2.12).

Применительно к продолжительности жизненного цикла микроорганизмов уравнение Моно-Иерусалимского может быть представлено в виде

$$g = g_{\min} (1 + K_s/[S])(1 + [P]/K_p). \quad (2.15)$$

Экспериментально было показано, что ингибирование роста популяции дрожжей этанолом (продукт-ингибитор) хорошо описывается уравнением (2.14).

§ 7. Управление метаболизмом микробной клетки с помощью кислотности среды

В связи с тем, что в Мировом океане и на большей части суши концентрация водородных ионов соответствует значениям, близким к нейтральным, преобладающая часть одноклеточных организмов адаптировалась к этим условиям, ставшим для них оптимальными.

Меньшая часть микроорганизмов приспособилась к жизни в сильнонокислых или сильнощелочных условиях, избавившись таким образом от большей части конкурентов. В ряде случаев микроорганизмы сами создают реакцию среды, непригодную для жизни своих потенциальных конкурентов (молочнокислые бактерии; дрожжи, образующие этанол, и др.). Для развития грибов благоприятна среда с $pH=4-6$, актиномицеты лучше растут в щелочной среде. По отношению микробов к кислотности среды их подразделяют на нейтрофилы, ацидофилы и алкалофилы (рис. 2.4). Максимальная скорость роста у

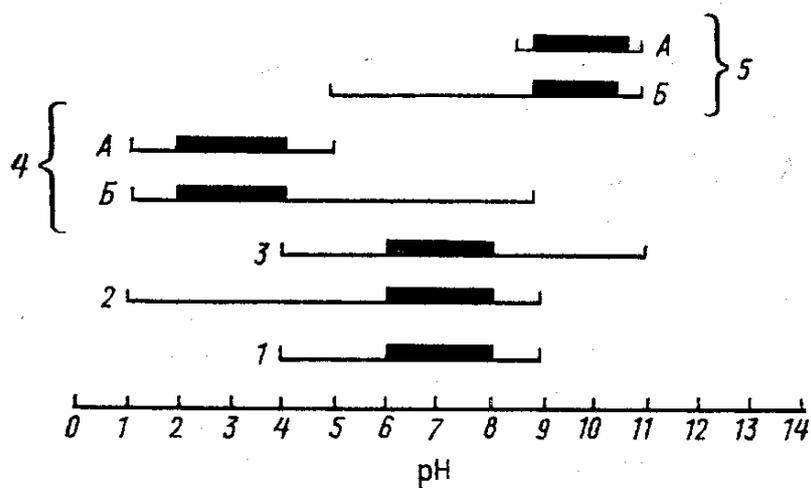


Рис. 2.4. Границы и оптимальные зоны роста прокариот в зависимости от pH и основанная на этом классификация. Нейтрофилы (1); группы кислотоустойчивых (2) и щелочеустойчивых (3) прокариот; ацидофилы (4) и алкалофилы (5). Облигатные (А) и факультативные (Б) формы. Жирной линией выделен оптимальный pH роста [44]

представителей каждой из этих групп имеет место при оптимальных для них значениях pH. Поэтому максимальную продуктивность по биомассе культивируемые в искусственных условиях микроорганизмы дают при своих оптимальных значениях pH, отклонение от которой в любую сторону ведет к снижению скорости роста. Негативные последствия изменения pH обусловлены прямым (непосредственным) и косвенным (опосредованным) действием ионов водорода на клетку. Прямое действие направлено непосредственно на клеточные структуры, косвенное - на компоненты внешней среды, а через них - на клетку. Так, при кислых значениях pH снижается растворимость углекислоты в окружающей среде, что негативно сказывается на росте автотрофных микроорганизмов. Растворимость же ряда солей и концентрация образующихся при их диссоциации катионов меди, молибдена, аммония в этих условиях напротив, повышается; концентрация названных катионов может достигать токсичных для клетки уровней. Степень диссоциации многих нетоксичных в норме органических кислот при низких значениях pH уменьшается, что позволяет им легко проникать в клетку, становясь токсичными для нее. В щелочной среде растворимость многих солей снижается, следствием чего является резкое уменьшение концентрации необходимых клетке катионов железа, кальция, магния, марганца [44]. Изменение pH во внешней среде может снизить каталитическую активность экзоферментов, осуществляющих гидролитическое расщепление макромолекул питательных веществ. Концентрация протонов во внешней среде влияет на величину электрического заряда поверхности клетки и электрического потенциала мембраны. Поскольку плазмалемма трудно проницаема для гидроксильных ионов и протонов, внеклеточная и внутриклеточная концентрации последних не уравниваются между собой, благодаря чему создается трансмембранный градиент ионов водорода, который совместно с электрическим потенциалом мембраны управляет мембранными реакциями [53]. Это управление, по-видимому, во многих случаях принимает участие в регуляции pH среды, сдвигая его в сторону нейтральных значений. При анаэробном метаболизме у многих бактерий при кислом значении pH наблюдается тенденция к образованию нейтральных продуктов, а при щелочных значениях pH происходит образование органических кислот. При сбраживании сахара дрожжами в кислой среде образуется этанол, в щелочной - глицерин и уксусная кислота [53].

Некоторые виды клостридий осуществляют ацетоно-бутиловое брожение. На первом этапе они образуют масляную кислоту. Однако по мере ее накопления в среде происходит снижение pH, что вызывает в клетках индукцию ферментов, обеспечивающих превращение

масляной кислоты в н-бутанол и ацетон. В результате бактерии снижают кислотность среды и противодействуют неблагоприятным условиям [51]. Другие виды бактерий нейтрализуют pH среды путем разрушения аминокислот. Так, у *E. coli* в кислой среде происходит индукция декарбоксилаз аминокислот, а в щелочной - дезаминаз. Декарбоксилирование аминокислот ведет к образованию аминов, смещающих кислую реакцию среды в щелочную сторону, а дезаминирование - к образованию органических кислот, смещающих щелочную реакцию среды в кислую сторону. Расходование на эти цели аминокислот вызывает снижение жизнеспособности клетки [45]. Кроме того, облигатные ацидо- и алкалофилы должны удалять из клеток протоны или гидроксильные ионы, поддерживая внутриклеточный pH в нейтральной области [44]. Таким образом, с помощью pH среды можно управлять не только скоростью образования биомассы, но и качественным составом образуемых микроорганизмами продуктов.

В отличие от кривой температурной зависимости скорости роста микроорганизмов, график зависимости μ_{\max} от pH среды имеет довольно симметричную форму (рис.2.5); график зависимости g_{\min} от pH среды имеет противоположную направленность (на рис. 2.5 не изображен).

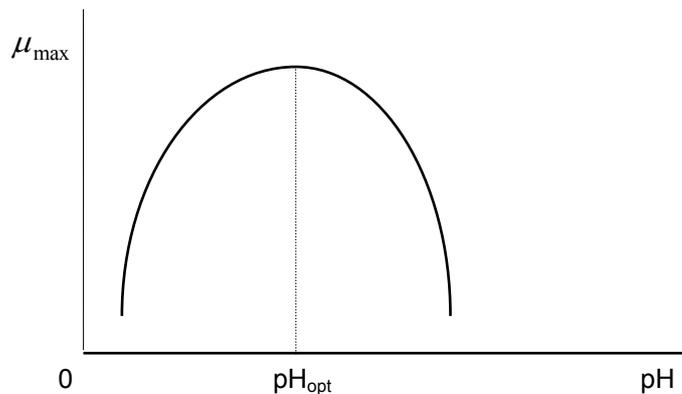


Рис.2.5. Влияние pH среды на максимальную удельную скорость роста бактерий

Для поддержания pH среды на необходимом уровне используют различные приемы. Иногда в среду добавляют буферные растворы. Для микроорганизмов, активно изменяющих кислотность среды, при-

менение буферов неэффективно. При их культивировании образующиеся кислоты нейтрализуют карбонатом кальция или стерильным раствором бикарбоната натрия. В современных ферментаторах требуемое значение pH поддерживается с помощью автоматических устройств, добавляющих в культуральную среду растворы кислоты или щелочи при постоянном контроле ее кислотности.

§8. Управление метаболизмом микроорганизмов с помощью температуры

В отличие от кислотности, значение которой внутри клетки может поддерживаться ей на некотором оптимальном уровне, температурные условия функционирования микроорганизмов в подавляющем большинстве случаев определяются температурой окружающей среды. В связи с тем, что температура на нашей планете как географически (территориально), так и в течение года изменяется в широком диапазоне, микроорганизмы в процессе эволюции вынуждены были приспосабливаться к существованию в этих условиях. Температурные границы выживания микроорганизмов, равно как и области температурных оптимумов роста и образования вторичных метаболитов, в целом достаточно широки (рис. 2.6).

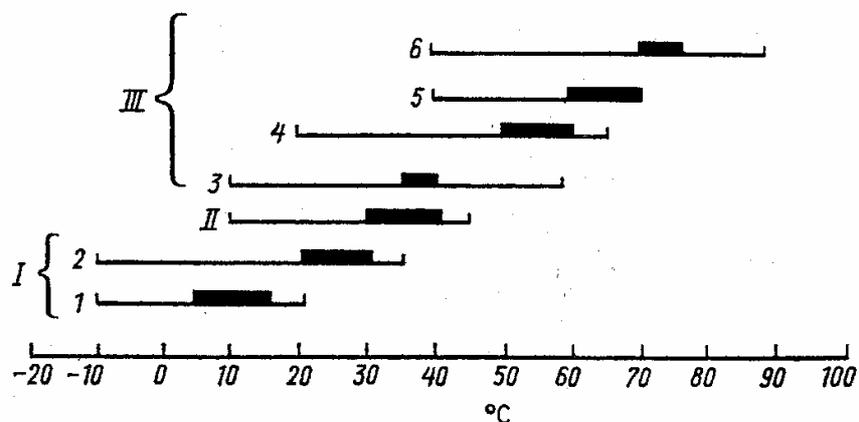


Рис. 2.6. Температурные границы и оптимальные зоны роста прокариот и основанная на этом классификация:
 I. Психрофилы: 1- облигатные; 2 - факультативные;
 II. Мезофилы. III. Термофилы: 3 - термотолерантные; 4 - факультативные; 5 - облигатные; 6 - экстремальные. Жирной линией выделены оптимальные температуры роста [44]

Классификации микроорганизмов по отношению их к температуре обычно дают несколько различающиеся значения температурных диапазонов.

Поскольку в соответствии с известной формулой Больцмана, абсолютная температура является мерой средней кинетической энергии поступательного движения молекул, воздействие этого физического фактора должно сказываться практически на все процессы, протекающие в клетке. Изменение температуры влияет на механические (включая агрегатное состояние), гидродинамические свойства биосистем и их окружения, растворимость веществ, скорость диффузии молекул, степень диссоциации и константу диссоциации электролитов, скорости реакций и т.д. Это многообразие проявлений температурной зависимости в живой клетке не позволяет, в отличие, например, от скорости отдельно взятой ферментативной реакции, вывести уравнение, которое связывало бы скорость образования биомассы со значением температуры. Влияние последней на любой признак проявляется в сложной, интегрированной форме. Лишь на участке, лежащем ниже температурного оптимума, где денатурация ферментов выражена слабо, удельная скорость роста популяции микроорганизмов с повышением температуры увеличивается приблизительно по экспоненциальному закону в соответствии с уравнением Аррениуса (рис. 2.7).

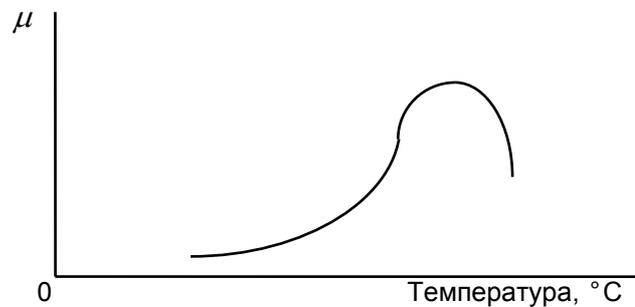


Рис. 2.7. Температурная зависимость удельной скорости роста микроорганизмов

Время удвоения популяции (и, соответственно, продолжительность жизненного цикла клеток) при этом убывает (рис. 2.8).

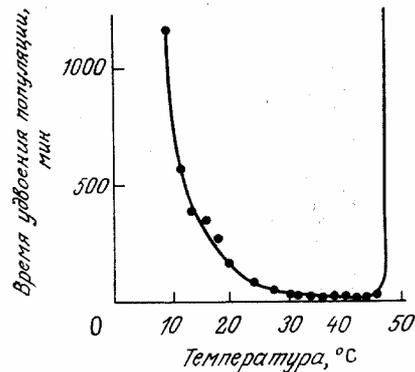


Рис. 2.8. Температурная зависимость времени удвоения популяции *E.coli* [58]

Температурные оптимумы для скорости роста микроорганизмов и образования вторичных метаболитов или сверхсинтеза промежуточных продуктов обмена могут различаться между собой.

Снижение температуры роста бактерий может привести к большому (на 10-20%) увеличению экономического коэффициента (выхода биомассы), рассчитанного по источнику углерода и энергии. Изменение температуры может изменять потребность в факторах роста и оказывать влияние на путь превращений источников энергии и глюкозы. Например, у *Lactobacillus brevis* окисление глюкозы при 24° идет по пути гетероферментативного молочнокислого брожения, а при 37° для окисления глюкозы требуется фруктоза в качестве акцептора водорода (с образованием маннита) [53].

Все эти обстоятельства необходимо учитывать при управлении культивированием микроорганизмов.

Важными достоинствами температуры, как управляющего воздействия, являются простота реализации, а также возможность изменения ее значения в широком диапазоне и поддержания на заданном уровне с помощью надежных технических средств.

§ 9. Управление ростом фототрофных микроорганизмов с помощью светового потока

Колоссальная энергия светового потока, обрушивающегося на нашу планету, благодаря деятельности фототрофных организмов становится движущей силой практически всех биосферных процессов. По подсчетам различных исследователей, водоросли, около 90% которых представлены фитопланктоном, образуют от четверти до половины всего количества органики в биосфере Земли [59]. Существенную долю фитопланктона составляют фототрофные одноклеточные организмы (микроводоросли, пурпурные и зеленые бактерии, цианобактерии). Обеспечение энергией всего мира живых существ является самой главной функцией фотобиологических систем, улавливающих свет. Ко второй группе фотобиологических систем относятся системы фоторегуляции, для которых свет является не источником энергии, а сигналом, запускающим сложную цепь последовательных изменений в организме [60]. Такие системы имеют как фототрофные, так и гетеротрофные микроорганизмы.

Первоначальным источником энергии и материи для формирующихся биологических систем на Земле были органические соединения, образовавшиеся абиогенным путем в условиях жесткой солнечной радиации и общего высокого энергетического фона среды. Появление конкурентных отношений первоначально в форме соревнования по скорости потребления субстратов переросло во взаимное поглощение одних биосистем другими. Прогрессивное увеличение общей массы простейших организмов привело к экологическому кризису, возникшему в результате истощения органических ресурсов (доступных источников энергии и углеродного питания) на планете [44]. Кризис был разрешен благодаря возникновению фотосинтезирующих организмов, способных к непосредственному усвоению световой энергии (в отличие от опосредованного, через абиогенные продукты питания, у существовавших доселе организмов). Расцвет организмов с кислородным фотосинтезом со временем резко изменил условия жизни на Земле, обогатив ее атмосферу кислородом. Последнему среда обитания обязана появлением защитного озонового слоя, способствовавшего выходу организмов на сушу. Наличие атмосферного кислорода обогатило биосферу хемоавтотрофными организмами [61], которые вовлекли в ее оборот дополнительный источник химической энергии.

Появление фотосинтеза не изменило гетеротрофного характера обмена веществ у всех одно- и многоклеточных организмов, оно ста-

ло лишь дополнительным (но чрезвычайно важным) звеном, увеличившим мощность потоков энергии и вещества (прежде всего за счет углекислого газа) в биосфере.

Таким образом, управление фототрофными организмами, как и гетеротрофными, возможно путем изменения скорости поступления субстратов (включая CO_2) в клетку. Дополнительным фактором, с помощью которого возможно управление функционированием фототрофных организмов, является свет.

В процессе эволюции систем фотосинтеза происходило их усложнение, стратегию которого можно проследить на примере существующих в настоящее время организмов.

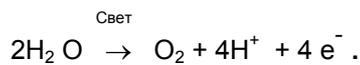
В зависимости от экзогенного источника электронов (и водорода), используемого при фотосинтезе, последний подразделяют на аноксигенный (бескислородный) и оксигенный (кислородный).

Наиболее простой и, по-видимому, самой древней является система бескислородного, бесхлорофилльного фотосинтеза, обнаруженная у галобактерий. Их цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) содержит белок бактериородопсин, ковалентно связанный с каротиноидом ретиналем. Эта система способна к светозависимому переносу протонов через ЦПМ, приводящему в конечном итоге к синтезу АТФ. Превращение энергии света в энергию АТФ у галобактерий происходит без участия электронтранспортной цепи. Они приспособлены к существованию в условиях недостатка кислорода, который они и сами не выделяют в окружающую среду.

Более сложным является бескислородный фотосинтез пурпурных и зеленых бактерий. Их фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов: светособирающих пигментов, фотохимических реакционных центров и фотосинтетических электронтранспортных систем [44]. Основными светособирающими компонентами этих бактерий являются бактериохлорофиллы, которые поглощают свет в синей и красной областях спектра. Пурпурные бактерии содержат бактериохлорофилл *a* (максимум поглощения 850-890 нм) и бактериохлорофилл *b* (с максимумом поглощения также в ближней инфракрасной области 1020-1040 нм). Максимумы поглощения бактериохлорофиллов зеленых бактерий сдвинуты в сторону более коротких волн: бактериохлорофилл *c* (750-760 нм), бактериохлорофилл *d* (720-740 нм), бактериохлорофилл *e* (715-725 нм). В небольшом количестве они содержат хлорофилл *a*. Диапазон используемого бактериями света расширен за счет каротиноидов с максимумом поглощения в сине-зеленой области (400-450 нм); поглощенную световую энергию каротиноиды передают бактериохлорофиллам. Энергия, поглощенная светособирающими пигментами, передается в реакционные

тры, осуществляющие превращение световой энергии в химическую. Реакционные центры содержат модифицированные длинноволновые формы хлорофилла, каротиноиды, специфические белки и другие молекулы. Роль первичного донора электрона в реакционном центре пурпурных и зеленых бактерий выполняет модифицированный хлорофилл P700 (П700). Перемещаясь по фотосинтетической электрон-транспортной системе электрон отдает свою энергию на синтез АТФ и темновое восстановление НАДФ⁺ до НАДФН.

Работа фотосистемы пурпурных и зеленых бактерий, названной фотосистемой I, ориентирована на использование в качестве доноров электронов восстановленных соединений серы и органических соединений. Функционирование этой фотосистемы не ведет к выделению кислорода в окружающую среду. Эта возможность появилась у фототрофных организмов с появлением дополнительной фотосистемы II, которая функционально предшествует фотосистеме I. Особенностью и достоинством фотосистемы II является способность использовать в качестве неограниченного источника электронов воду. Восстановление воды в реакционном центре фотосистемы II происходит по схеме



Электроны, образующиеся при восстановлении воды, акцептируются радикалами хлорофилла, который возвращается в исходное невозбужденное состояние. Фотовосстановление воды сопровождается выделением кислорода в качестве побочного продукта, поэтому такой фотосинтез получил название кислородного (оксигенного). Из прокариот способны к кислородному фотосинтезу (имеют одновременно I и II фотосистемы) прохлорофиты и цианобактерии. Поскольку для восстановления воды требуется большая энергия, светособирающие пигменты фотосистемы II имеют более коротковолновый максимум поглощения.

Цианобактерии в качестве светособирающих пигментов используют хлорофилл *a* (максимум поглощения 680-685 нм), а также фикобилипротеиды (450-700 нм) и каротиноиды (400-550 нм), передающие энергию возбуждения соответственно на фотосистемы II и I. Прохлорофиты в качестве светопоглощающих пигментов используют помимо хлорофилла *a* хлорофилл *b* (650-660 нм). В реакционном центре фотосистемы II в качестве первичного донора электронов выступает модифицированный хлорофилл P680 (П680). Обе фотосистемы связаны между собой электронтранспортной цепью.

Аналогичным образом происходит фотосинтез и у эукариотических организмов (одноклеточных и многоклеточных водорослей, высших растений).

Совместная работа обеих фотосистем осуществляется по следующей схеме (рис. 2.9). Электрон, отобранный фотосистемой II у молекулы воды, перемещаясь по фотосинтетической электронтранспортной системе, соединяющей фотосистему II с фотосистемой I, отдает свою энергию на образование молекулы АТФ (фотофосфорилирование). Фотосистема I поставляет высокоэнергетические электроны, которые по цепи переносчиков электронов передаются на НАДФ⁺ и восстанавливают его в НАДФН. Если клетка обеспечена НАДФН, но нуждается в дополнительном количестве АТФ, происходит переключение потоков электронов из реакционного центра фотосистемы I на фотосинтетическую электронтранспортную систему, соединяющую обе фотосистемы, где энергия этих электронов расходуется на образование молекул АТФ (циклическое фотофосфорилирование).

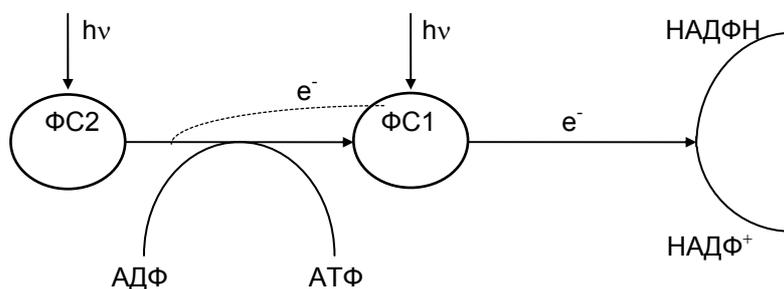


Рис. 2.8. Совместная работа фотосистем I и II (ФС1 и ФС2). Пунктирной линией обозначен циклический поток электронов

Работа светособирающих пигментов, фотохимических реакционных центров и фотосинтетических электронтранспортных систем слабо зависит от температуры, но является светозависимой. Однако фотосинтез включает и фиксацию (восстановление) углекислого газа с образованием глюкозы (цикл Кальвина). Как показали исследования, этот процесс связан с протеканием ферментативных реакций, скорость которых напрямую не зависит от света, но зависит от температуры. Их назвали темновыми реакциями фотосинтеза.

Тем не менее, скорость темновых реакций косвенно зависит от освещенности. В частности, рибулозодифосфат-карбоксилаза, катализирующая фиксацию CO_2 , активируется при освещении за счет происходящего при этом повышения рН стромы хлоропласта, поступления в нее ионов магния и накопления НАДФН, генерируемого фотосистемой I при освещении. Таким же образом активируются в результате освещения хлоропластов и некоторые другие ферменты цикла Кальвина, а также АТФ-синтетаза [62].

Остроумными опытами отечественных и зарубежных физиологов растений с прерывистым освещением было показано, что фотосинтез включает очень короткую (10^{-5} с) фотохимическую (светозависимую) и более продолжительную (для хлореллы при 25° - $4 \cdot 10^{-2}$ с, при 1° - $4 \cdot 10^{-1}$ с) стадии [63]. Первую назвали световой, вторую - темновой. Это обстоятельство указывает на необходимость при управлении ростом фототрофных организмов учитывать соотношение продолжительности световой и следующей за ней темновой стадии фотосинтеза.

Для количественной оценки зависимости роста фототрофных организмов (как функции фотосинтеза) от интенсивности светового потока в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) предложено множество математических моделей. Простейшая из них основана на приравнивании света к энергетическому субстрату, концентрация которого может быть выражена через объемную концентрацию поглощаемых клеткой фотонов. В этом случае зависимость удельной скорости роста μ фототрофных микроорганизмов от освещенности E носит гиперболический характер:

$$\mu = \frac{aE}{b + E}, \quad (2.16)$$

где a и b - константы, смысл которых определяется по аналогии с соответствующими константами в уравнении Михаэлиса-Ментен для скорости ферментативной реакции. В общем случае в уравнение (2.16) добавляется отрицательный член μ_g , не зависящий от непосредственного действия света на фотосинтетический аппарат и количественно варажающий убыль массы клетки в процессе ее дыхания:

$$\mu = \frac{aE}{b + E} - \mu_g. \quad (2.17)$$

Уравнение (2.16) предполагает наличие светового насыщения, когда возрастание освещенности в области высоких интенсивностей практически не ведет к увеличению μ . Более того, ее значение начинает снижаться, что свидетельствует об увеличении с ростом освещенности скорости расходования биомассы в процессе дыхания. Возможны различные механизмы ингибирования роста биомассы светом. Одним из них, в частности, может быть некоторое повышение температуры клетки при высоких освещенностях. Известно, что температурный коэффициент Q_{10} фотосинтеза с повышением температуры снижается. Для хлореллы, например, в интервале $0-10^\circ$ он равен 4,9, а в интервале $20-30^\circ$ всего лишь 1,6 [63]. Интенсивность дыхания при этом, напротив, прогрессивно увеличивается с температурой [63]. Все это обуславливает появление максимума μ при определенной оптимальной освещенности E_{opt} (рис. 2.10).



Рис. 2.10. Зависимость удельной скорости роста μ фототрофных микроорганизмов от освещенности E

Характерно, что водоросли с более выраженной термофильностью имеют более высокие значения E_{opt} [59]. Не исключено, что с увеличением освещенности нарастает ингибирование фотосинтеза повышающейся концентрацией кислорода, которое, в частности, сильно выражено у цианобактерий [59].

Кроме того, на скорость фотосинтеза влияет повреждающее пигменты действие света, которое возрастает с увеличением освещенности.

Таким образом, зависимость продолжительности жизненного цикла у фототрофных микроорганизмов от освещенности имеет качественное сходство с зависимостью от концентрации лимитирующего субстрата (рис. 2.1 и 2.2).

Поскольку существуют различающиеся по длительности стадии фотосинтеза, появилась возможность управлять ростом фототрофных организмов путем изменения длительности вспышек света и периодов темноты при освещении прерывистым светом. Было показано, что длительные фотоимпульсы требуют и более длительных периодов темноты. В опытах с хлореллой [59] максимальные значения μ и энергетического КПД фотосинтеза имели место при соотношении длительности темновых и световых интервалов $\tau_{\text{тем}} / \tau_{\text{св}}$, равном 2 ($\tau_{\text{св}} = 2$ мс).

На скорость фотосинтеза оказывает влияние спектральный состав света. Точные границы ФАР еще не установлены. Большинство исследователей в нашей стране областью ФАР считают спектральный диапазон 380-710 нм [64]. В границах этого диапазона разные его участки оказывают преимущественное воздействие на разные светопоглощающие молекулы, что позволяет в определенной мере избирательно влиять на работу отдельных звеньев фотосинтетического аппарата. Так, в частности, вывод о существовании двух фотосистем (I и II) был сделан по результатам освещения хлоропластов длинноволновым (700 нм) и более коротковолновым (600 нм) светом. Освещение только длинноволновым светом (700 нм) приводило к резкому падению скорости выделения кислорода, так как практически не работала фотосистема II [62].

Клетки как низших, так и высших растений обладают способностью изменять концентрацию фотосинтетических пигментов в ответ на изменение интенсивности и спектрального состава света. Это обстоятельство в еще большей мере усложняет математическую модель, выражающую зависимость показателей роста фототрофных организмов от освещенности.

Таким образом, у фототрофных организмов, в отличие от гетеротрофных, имеется дополнительный набор управляющих воздействий, связанных с параметрами светового потока, которые позволяют целенаправленно изменять в широком диапазоне скорость роста клеток.

§ 10 . Управление метаболизмом микробной клетки с помощью индукторов

Ферменты, синтез которых не зависит от присутствия субстрата в среде, называются конститутивными. К ним относятся преимущественно внутриклеточные ферменты (например гликолитические), хотя встречаются и внеклеточные конститутивные ферменты, в том числе

некоторые промышленно важные бактериальные амилазы и протеазы. Их гены транскрибируются постоянно. Однако более распространенным является индуцибельный синтез ферментов, скорость которых определяется содержанием в среде индукторов. В отсутствие индуктора индуцибельные ферменты синтезируются с низкой (базальной) скоростью. Индуктор резко увеличивает скорость их синтеза, в результате чего через небольшой отрезок времени концентрация этих ферментов может превысить исходную на два-три порядка. Ускоренный синтез продолжается до тех пор, пока в среде находится индуктор. После удаления его скорость возвращается к базальному уровню. Индукция осуществляется на уровне транскрипции. Индуктором фермента обычно является субстрат или его производное, хотя в роли индукторов могут выступать и неметаболизируемые вещества ("беспричинные" индукторы).

В зависимости от механизма индукции различают координированную индукцию и последовательную. В первом случае субстрат, содержащийся в среде, включает почти одновременный синтез всех ферментов, необходимых для его распада. Такой механизм обнаружен для коротких последовательностей катаболических реакций, в частности, обеспечивающих усвоение клеткой *E.coli.* лактозы. Индукция лактозного оперона аллолактозой (изомером лактозы, образующимся из нее при участии β -галактозидазы) ведет к практически одновременной транскрипции структурных генов β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и галактозидтрансацилазы. Координированная индукция имеет место при синтезе ферментов пути Энтнера-Дудорова, метаболизма арабинозы и др. Последовательная индукция обнаруживается в случае длинных катаболических путей, которые приводят к распаду нескольких субстратов, например при синтезе ферментов, катализирующих распад ароматических соединений [65]. При последовательной индукции исходный субстрат S_1 индуцирует синтез первого фермента (E_1), который расщепляет этот субстрат с образованием продукта S_2 . Последний, в свою очередь, является индуктором следующего в метаболической цепочке фермента (E_2), который катализирует S_2 и образует индуктор S_3 для фермента E_3 , и т.д. Существует также смешанный механизм индукции, сочетающий оба рассмотренных механизма. Примером может служить путь использования экзогенной лактозы. Аллолактоза индуцирует координированный синтез ферментов, осуществляющих транспорт дисахарида лактозы в клетку и расщепление ее до моносахаридов (глюкозы и галактозы). Накапливающаяся галактоза, в свою очередь, индуцирует координированный синтез ряда ферментов, превращающих ее в глюкозо-1-фосфат.

В случае индукции *lac*-оперона (три структурных гена с промотором и оператором) индуктор проникает в клетку и соединяется с белком-репрессором, лишая его возможности блокировать транскрипцию соответствующих структурных генов. Это пример механизма отрицательной регуляции. Наоборот, для оперонов, кодирующих ферменты катаболизма арабинозы, мальтозы и рамнозы у *E. coli*, характерна положительная регуляция. В этом случае необходимым условием транскрипции является взаимодействие оператора с активатором, состоящим из белка-репрессора и индуктора [65].

Эффективными индукторами часто являются неметаболизируемые (нерасщепляемые ферментами) аналоги субстратов. В частности, индуктором для β -галактозидазы является изопропил- β -тио-D-галактозид (ИПТГ).

Для получения индуцибельных ферментов культивирование микроорганизмов ведут в присутствии индуктора. Для амилаз - это крахмал, для инвертазы - сахароза, для пенициллиназы - бензилпенициллин и т.д.

Управление биосинтезом нужных ферментов в рассматриваемом случае ведется с использованием естественной системы регуляции, порой вместо естественных индукторов применяются искусственные. Индукция ферментов является одним из эффективных способов воздействия на скорость их образования путем активации процесса транскрипции.

§ 11. Управление функциями микроорганизмов путем изменения структуры генома

Рассмотренные ранее способы управления функциями микроорганизмов не затрагивали структуры их генома, они лишь изменяли условия для фенотипического проявления наследственной информации. Такое управление осуществлялось в границах, заданных геномом, и носило лишь количественный характер, не внося ничего нового в спектр возможных продуктов клеточного метаболизма. Вмешательство в структуру генома позволяет наряду с изменением количественных характеристик функционирования микроорганизмов влиять на качественный состав продуктов метаболизма. При управлении функциями микроорганизмов через структуру генома целенаправленно воздействуют прежде всего на структурные гены и регуляторные элементы генома путем их химической модификации и изменения локализации. Известные способы воздействия на геном условно делят на две группы: реализуемые в условиях *in vivo* и *in*

in vitro [66]. В первой группе, как правило, используются механизмы, выработанные в процессе эволюции и действующие в естественных условиях. Сюда относятся мутагены, гибридизация эукариотических микроорганизмов, конъюгация бактерий, трансдукция, трансформация.

Изменчивость - один из трех “китов” биологической эволюции (изменчивость, наследственность, естественный отбор) - на генетическом уровне проявляется в форме цитоплазматических и (или) хромосомных мутаций. Для направленного изменения наследственности микроорганизмов наибольший интерес представляют хромосомные и внутригенные мутации. Внутрихромосомные мутации (перестройки) включают делеции (выпадения участков хромосомы), дупликации и амплификации (удвоения или умножения числа отдельных генов или их группы), транспозиции (вставки участков хромосом в новые места), транслокации (обмен участками между хромосомами), инверсии (изменения порядка расположения генов на хромосоме). Внутригенные мутации возникают путем выпадения, вставки или замены оснований ДНК в пределах одного гена [66]. По своему происхождению мутации бывают спонтанными и индуцированными. Спонтанные мутации возникают с низкой частотой и носят ненаправленный характер. Применение физических (радиация, ультрафиолетовое облучение) и химических мутагенов ведет к индукции мутаций, то есть к резкому увеличению частоты их возникновения у микроорганизмов. Мутации и в этом случае остаются ненаправленными, хотя вид мутагена в определенной мере определяет механизм его действия и тип мутации. Последние представляют собой материал для искусственного отбора, который по сути и является процессом управления структурой генома.

Техническая реализация отбора нужных мутантов (управления) отличается большим разнообразием (выращивание на селективных средах, использование метода реплик, индикаторных чашек, изучение морфологии колоний, прогревание культур и т.д.). В плане практического использования представляют интерес мутации аутофлюоресценции и устойчивости к антибиотикам (с повышенным выходом целевого продукта), увеличенной проницаемостью плазматической мембраны, мутанты, способные усваивать новые субстраты и др. В частности, так называемый ступенчатый отбор, основанный на получении и выделении мутантов, позволил в 400 раз повысить выход пенициллина по сравнению с исходным штаммом.

В отличие от мутационной изменчивости, гибридизация ведет лишь к перераспределению (рекомбинации) генов между клетками. Типичный процесс рекомбинации начинается со слияния (копуляции)

гаплоидных клеток двух штаммов микроорганизмов и последующего слияния их ядер. Затем наступает мейоз, завершающийся образованием четырех гаплоидных клеток с разными сочетаниями гомологичных участков хромосом. В связи с тем, что для каждой слившейся пары родительских клеток последующий мейоз сопровождается качественно различным перекрестом хромосом (кроссинговером), в популяции копулирующих клеток после мейоза образуется большое количество различающихся по генному составу гаплоидных клеток. Применяя процедуры отбора, можно выделить из совокупности гаплоидных клеток такие, которые имеют желательное для исследователя сочетание генов.

Эффективным способом перераспределения генетической информации между бактериальными клетками является конъюгационный перенос ее с помощью плазмид. В простейшем случае при непосредственном контакте двух клеток одна из них (донор) передает другой (реципиенту) плазмиду, кодирующую белок, например фермент, способный осуществить деградацию какого-либо соединения в окружающей среде. Плазмиды могут конъюгировать между собой и образовывать гибридные плазмиды. Более того, они могут интегрироваться в бактериальную хромосому и затем исключаться из нее с захватом части хромосомных генов. Попав в клетку другого штамма, эта плазида может интегрироваться в ее хромосому, передав последней ранее захваченную часть хромосомы, то есть осуществить межхромосомный перенос генетической информации. Так создается генетически разнообразный материал, необходимый для последующего отбора.

Переносить генетическую информацию из одной бактериальной клетки в другую могут и бактериофаги. Такой перенос называется трансдукцией. Суть ее заключается в том, что ДНК фага включается в бактериальную хромосому (сайт-специфическая рекомбинация). Обратный процесс - вырезание ДНК фага - может сопровождаться включением в нее участка ДНК бактерии-донора. При последующем заражении клетки другого штамма фагом, несущим участок бактериальной ДНК, последний включается в геном этой клетки (реципиента) и образует рекомбинантный штамм - трансдуктант. Фаги могут участвовать и в межклеточном переносе целых плазмид или их фрагментов. Отбор трансдуктантов ведется на селективных средах.

Перспективным в плане управления структурой генома является использование транспозонов, которые представляют собой дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению в пределах одного репликона, а также из одного репликона в другой. Транспозоны образованы на основе так называемых IS-элементов

(или их производных), которые являются своего рода средством, осуществляющим этот перенос (транспозицию). Они представляют собой линейные фрагменты ДНК, которые содержат гены, необходимые только для транспозиции. Перемещаемая транспозоном генетическая информация (участок ДНК) заключена между IS-элементами. Перенос транспозона из одной клетки в другую осуществляется с помощью фагов или плазмид, в ДНК которых он встраивается.

Процесс переноса генетической информации, впервые описанный у бактерий еще в 1928 г. Ф.Гриффитом и названный трансформацией, позволяет вводить в клетку-реципиент и экспрессировать хромосомную и (или) плазмидную ДНК, выделенную из клетки-донора. Применительно к введению в бактериальную клетку выделенной ДНК фагов этот процесс называется трансфекцией. Трансформация ДНК начинается с ее прикрепления (адсорбирования) к поверхности клетки и последующего проникновения через клеточную оболочку внутрь. В процессе этого проникновения одна из нитей ДНК разрушается, а другая поступает в клетку и образует с гомологичным участком ДНК реципиента комплекс (синапс), при этом соответствующий участок другой нити ДНК реципиента удаляется из хромосомы и заменяется участком ДНК донора. Затем происходит восстановление непрерывной структуры на этом гетеродуплексном (гибридном) участке ДНК. В естественных условиях не все виды микроорганизмов и не всегда способны к трансформации. У многих из них трансформация наступает лишь на стадии компетентности, которой соответствует определенная фаза роста. В искусственных условиях с помощью химических или физических факторов можно индуцировать компетентное состояние у большого числа видов микроорганизмов-реципиентов. Эти факторы воздействуют на структуру клеточных мембран, благодаря чему частота трансформации увеличивается на 2-3 порядка.

Универсальным способом объединения целых геномом клеток и всех их цитоплазматических компонентов является слияние протопластов, которые представляют собой клетки микроорганизмов, лишенные клеточной стенки. Слившиеся протопласты образуют фузант, объединяющий в себе генетическую информацию обеих родительских клеток. Протопластирование осуществляется в искусственных условиях применительно к микроорганизмам и клеткам растений (подробнее описано в главе 3). Оно позволяет получать гибриды трех и более родительских клеток, порою таксономически далеких друг от друга.

Большие возможности управления структурой генома открылись в первой половине 70-х годов. Они связаны с разработкой генно-инженерной технологии, которая позволяет *in vitro* производить сложные манипуляции с выделенными из клетки фрагментами ДНК, затем

затем вводить их в клетку и экспрессировать. Полученная таким образом ДНК, названная рекомбинантной, в клетках может быть многократно реплицирована (клонирована).

Типичная генно-инженерная технология получения рекомбинантных ДНК включает ряд последовательных этапов: 1) получение фрагментов ДНК; 2) конструирование *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК путем соединения полученных на первом этапе фрагментов ДНК с автономно реплицирующимися структурами, названными векторами; 3) введение рекомбинантных молекул ДНК в клетку-реципиент и клонирование их; 4) отбор клонов, несущих нужную рекомбинантную молекулу.

Наиболее перспективным и сложным является получение рекомбинантных ДНК на основе ДНК эукариотических организмов с последующим клонированием в клетках микроорганизмов. Сложность связана с тем, что большинство структурных генов эукариот состоит из чередующихся кодирующих участков ДНК (экзонов) и некодирующих (интронов). Удаление интронных участков РНК (сплайсинг) происходит в эукариотической клетке, после чего образуется зрелая мРНК, способная к трансляции белка. Для получения рекомбинантной ДНК определенного гена необходимо использовать ткань, в которой мРНК этого гена образуется в наибольшем количестве [73]. С помощью обратной транскриптазы (ревертазы) и ДНК-полимеразы *in vitro* получают различные комплементарные ДНК (кДНК) для выделенных из этой ткани зрелых мРНК. Затем полученные молекулы кДНК вводят в состав плазмидного гена или генома бактериофага, которые служат векторами. Предварительно участок вектора, в который предполагается встроить кДНК, расщепляют с помощью соответствующего фермента - рестриктазы, узнающей этот участок. Встраивание кДНК в плазмиду или геном вируса осуществляется с участием ДНК-лигазы. Полученные таким образом рекомбинантные ДНК переносят с помощью трансформации (или трансфекции) в подходящую реципиентную клетку, роль которой часто выполняет бактерия *E.coli*. Эти бактерии выращивают на поверхности питательной среды, после чего осуществляют поиск той колонии, которая содержит нужную рекомбинантную ДНК. Поиск часто производят с помощью радиоактивного зонда (меченой денатурированной ДНК или РНК, несущей участок, комплементарный искомому гену), вступающего в контакт с лизированными колониями бактерий. Другие способы основаны на экспрессии включенных в рекомбинантные ДНК генов. Идентифицируют или белок, образующийся при трансляции (иммунологическим методом), или, если белок является ферментом, обнаруживают продукт его ферментативной реакции.

Важное требование, которое предъявляется к бактериям, несущим нужную рекомбинантную ДНК, обычно состоит в получении большого количества какого-либо белка эукариот с помощью белоксинтезирующего аппарата этих бактерий. Чтобы уровень экспрессии чужеродного гена был достаточно высоким, его нужно встроить вблизи от активного промотора транскрипции, при этом образующаяся мРНК должна эффективно транслироваться. Обычно промоторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии чужеродного гена, изначально не являются принадлежностью плазмиды, а переносятся в нее из фага или хромосомы. Любопытным примером управления работой промотора P_L бактериофага λ является воздействие на него (через оператор) термочувствительного белка-репрессора, который активен при 30°, но не работает при 42°. Это обстоятельство позволяет управлять экспрессией гена с помощью физического фактора - температуры [73].

Скорость образования чужеродного белка в бактериальной клетке в большой мере зависит от числа копий плазмиды в клетке. В присутствии хлорамфеникола они могут умножаться независимо от деления хромосомы бактерии, при этом количество копий иногда достигает 1000-2000 на клетку. Такой же эффект может быть получен у температурно-чувствительных мутантных плазмид, что может привести к сверхсинтезу продуктов плазмидных генов [74]. Обычно используемые плазмиды содержатся в количестве 20-50 копий на клетку. Высокий уровень транскрипции может привести к нестабильности плазмидной репликации, а сверхсинтез многих белков оказаться губительным для клетки. Поэтому при всей привлекательности сверхсинтеза белков необходим компромисс в выборе числа копий плазмид на клетку.

Повышение скорости трансляции белков бактериями, особенно продуктов чужеродных генов, должно быть дополнено высокой скоростью секреции их в культуральную среду. Процесс транслокации белков через цитоплазматическую мембрану (ЦПМ) у грамположительных бактерий и дополнительно через периплазматическое пространство и внешнюю мембрану у грамотрицательных бактерий очень сложен. Он сопряжен с трансляцией белков, определяется их структурой, строением липидной мембраны, белковыми компонентами секреторного аппарата. Существуют несколько концепций, объясняющих механизм транслокации белка через мембрану (транслокация с помощью транслокатора белковой природы; непосредственно через липидный бислой; сопряжения транслокации белка с трансмембранным передвижением фосфолипидов). Наличие большого числа участников транслокации делает возможным управление скоростью этого процесса различными способами. Так, с помощью мутаций или соответствующего со-

става среды может быть изменен фосфолипидный состав ЦПМ, следствием чего является неспецифическое увеличение ее проницаемости для многих молекул. Одним из недостатков такого ускорения транспорта веществ через мембрану является накопление в культуральной среде большого числа разных соединений, что затрудняет выделение в чистом виде целевого продукта. Поэтому более перспективной является активация специфических систем экскреции, например, путем мутации генов, контролирующих состав отдельных белков секреторного аппарата, сигнального пептида секретируемого белка (он участвует в различных этапах секреции белка), самого секретируемого белка, от структуры которого в определенной мере зависит скорость его прохождения через ЦПМ. Сверхсинтез секретируемого белка также является своего рода специфическим способом ускорения его транслокации.

Еще бóльшие возможности специфического повышения экскреции белков открывают методы генетической инженерии. Было показано, что сигнальные последовательности у различных клеток имеют много общего, благодаря чему эукариотические сигналы узнаются в бактериях, сигналы грамположительных бактерий - в грамотрицательных и наоборот. Для выведения чужеродных белков, синтезированных в бактериальной клетке, используют ее секреторные векторы. Они содержат регуляторную, рибосомсвязывающую и сигнальную области секретируемых бактериальных белков, которые будучи связанными со структурными генами чужеродных белков выводят последние из клетки. Для создания экспрессионно-секреторных векторов используются плазмиды, которые должны быть мультикопийными и нести высокоэффективные и строго контролируемые промоторы [75]. Определенные сложности связаны с секрецией белков из периплазматического пространства через внешнюю мембрану. Для облегчения их выхода используются мутации, вызывающие нарушение состава внешней оболочки, конструирование специальных секреторных векторов, секреция белков непосредственно из цитоплазмы через зоны контакта цитоплазматической и внешней мембраны и др. Все это позволяет практически любой белок превратить во внеклеточный, что чрезвычайно важно для микробиологического производства [41].

Таким образом, управление структурой генома одноклеточных организмов, начавшись с селекции мутантных форм, возникающих в результате ненаправленного мутагенеза, пришло к целенаправленному конструированию генома методами генетической инженерии. Чужеродная ДНК, встроенная в вирус или плазмиду, имеющую общее происхождение с истинными вирусами [76], ведет себя в клетке - хозяине подобно вирусу как внутриклеточный паразит. Как и при ти-

пичном вирусном паразитизме [77], в клетке с использованием ее ферментативных систем происходит не только репликация рекомбинантной ДНК, но и в конечном счете биосинтез белковых молекул, запрограммированных на кДНК. Типичный случай функционирования бактерии с включенной в нее рекомбинантной ДНК напоминает вирогению - сосуществование клетки и умеренного вируса. И здесь ученые используют существующие в природе генетические механизмы. Принципиально новым является лишь управленческий аспект решаемых задач - исходная направленность процесса на получение нужного продукта, хотя опять же в качестве основы используется информация ДНК, "наработанная" в ходе биологической эволюции. Полезным дополнением индуцированного мутагенеза *in vivo* являются новые методы мутагенеза - локализованный и сайт-специфический, которые осуществляются *in vitro*. Локализованный мутагенез основан на получении мутации в отдельном фрагменте ДНК, что позволяет избежать появления нежелательных мутаций в остальной части ДНК, с которой затем мутантный фрагмент вновь объединяется. Сайт-специфический мутагенез позволяет вводить мутацию (новый нуклеотид) еще более локально - в точно определенный участок гена. Кроме того, есть положительные результаты химико-ферментативного синтеза генов. Хотя при этом осуществляют лишь искусственное воспроизведение (копирование) существующих в природе генов, данная технология позволит в будущем синтезировать искусственные, не существующие в природе гены, кодирующие белки с заданными свойствами. Для этого нужно решить сложнейшую проблему белковой инженерии - установить связь между первичной структурой белковой молекулы и, в конечном счете, ее свойствами. Работы в этом направлении ведутся.

При конструировании генетически химерных одноклеточных организмов, каковыми являются микроорганизмы, несущие рекомбинантные ДНК, стоит та же задача, что и перед создателями новых пород животных и сортов растений в сельском хозяйстве: получить организмы с максимальной трансформацией продуктов питания и энергии в целевой продукт и минимальными затратами на собственные потребности. В этом отношении идеальным в экономическом отношении промышленным микроорганизмом является тот, который большую часть потребляемых субстратов расходует на образование целевого продукта и меньшую - на поддержание минимального набора жизненно необходимых для него отправлений. При этом за ним необходимо сохранить опять же минимальный набор автономно регулируемых функций, остальные функции должны управляться системами, позволяющими человеку-оператору задавать оптимальные параметры культивирования

микроорганизмов, используя и ранее рассмотренные способы воздействия, не затрагивающие структуру генома.

ГЛАВА ТРЕТЬЯ

УПРАВЛЕНИЕ КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

§ 1. Структурные и функциональные особенности клеток многоклеточных организмов

подавляющее число клеток многоклеточных организмов имеют оформленное ядро, отграниченное от цитоплазмы ядерной оболочкой. По объему они превосходят прокариотические клетки в среднем на три порядка; приблизительно то же можно сказать и о содержании в них ДНК. В частности, количество ДНК в клетке человека и многих других млекопитающих приблизительно в 600 раз больше, чем в клетке *E.coli* [78]. Соматические клетки, как правило, содержат диплоидный набор хромосом. Совокупность всех генов, содержащихся в гаплоидном наборе хромосом клетки, образует геном организма, которому принадлежит эта клетка. Хромосомы гаплоидного набора различаются между собой.

Как правило, все соматические клетки организма содержат одинаковый набор генов. Несмотря на это, существует большое число типов клеток, различающихся между собой по строению и выполняемым функциям. В частности, в организме человека имеется более 200 различных типов клеток [79]. Это обусловлено тем, что в каждом типе клеток находится в активном состоянии свой, небольшой по отношению ко всему геному набор генов.

Одноклеточные организмы приспособлены к самостоятельному существованию в условиях внешней среды. Клетки многоклеточных организмов могут существовать только в составе этого организма, который для них является своего рода средой обитания. Их общение с внешней средой опосредованное, через реакцию всего организма как целостной системы. При культивировании клеток многоклеточных организмов *in vitro* необходимо создавать условия, близкие к тем, которые для них создает многоклеточный организм. Сюда, в частности, относятся определенное значение температуры, pH и химический состав окружающей клетку среды, постоянная доставка в клетку

многочисленных компонентов питания, кислорода и удаление продуктов обмена, защита от микроорганизмов и др.

По способу питания клетки многоклеточных организмов как животных, так и растений относятся к гетеротрофам.

В отличие от прокариот большинство клеток многоклеточных организмов имеют ограниченную способность к делению, а получив способность к неограниченному делению, часто утрачивают свою дифференцировку.

Для делящихся клеток многоклеточных организмов характерно не только четко выраженное разделение на специализированные компартменты (органеллы), но и сложный, дифференцированный во времени жизненный цикл.

Большая часть клеток многоклеточных организмов находится в механически и метаболически связанном друг с другом состоянии. Будучи элементами единой системы, они имеют на своей поверхности различные рецепторные структуры и обладают средствами межклеточной коммуникации.

Клетки многоклеточных организмов обладают способностью не только к дифференциации (специализации), но в ряде случаев и к дедифференциации (потере специализации) и переходу к пролиферации, а также к редифференциации (переходу специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое).

Соматические клетки растений характеризуются тотипотентностью - способностью образовывать из одной клетки целый организм. В последние годы эта способность, хотя и в более ограниченной мере, была продемонстрирована также для соматических клеток млекопитающих.

Эти и другие особенности строения и функционирования клеток многоклеточных организмов создают как новые возможности для их практического использования, так и серьезные сложности при культивировании *in vitro*.

§ 2. Культивирование растительных клеток

Основным источником для получения культуры изолированных растительных клеток является каллусная ткань (каллус), которая представляет собой особый тип дифференцированной ткани, возникающей обычно при травмах растений. Она принимает участие при регенерации поврежденных частей растения. В лабораторных условиях каллусную ткань получают из фрагментов различных органов растений. Для этого кусочки корня, стебля, мезофилла листа и других

специализированных тканей (экспланты) помещают на питательную среду, содержащую помимо минеральных солей, источника углерода, витаминов, дополнительно регуляторы роста. В этих условиях утрачивается эпигенетический контроль со стороны растения и происходит дедифференцировка клеток экспланта, которые начинают делиться, образуя первичную каллусную ткань. В связи с тем, что эксплант часто содержит клетки разных тканей, образующаяся из них каллусная ткань будет гетерогенной, ее клетки будут различаться между собой морфологически и функционально. Взятая из каллуса отдельная клетка при выращивании на питательной среде дает клон - совокупность одинаковых клеток.

Химический состав каллусных клеток зависит от вида растения, ткани, из которой они получены, условий культивирования, экспериментальных воздействий, оказываемых на них (мутагенез, соматическая гибридизация и др.). Путем селекции из совокупности таких разнородных клеток могут быть отобраны экземпляры, способные дать начало линиям, характеризующимся повышенной концентрацией практически важных соединений. Большинство из них применяются в фармацевтике: атропин, аймалицин, эфедрин, убихинон-10, токоферол, резерпин, рутакридон, никотин и многие другие [80].

Клетки растений выращивают в стерильных условиях. В отличие от микроорганизмов, для их интенсивного роста требуются достаточно сложные по составу питательные среды, которые имеют определенные различия в зависимости от вида растения - источника клеток, и способа культивирования (в суспензии или на твердой питательной среде). В качестве примера ниже приведен состав питательной среды Мурасиге и Скуга (в мг на 1 литр), применяемой для выращивания изолированных тканей и клеток растений [81]:

NH_4NO_3	1650	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
KNO_3	1900	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	Сахароза	30000
KH_2PO_4	170	Агар-агар	10000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	Тиамин	0,4
$\text{Na}_2\text{-ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	Мезоинозит	100
H_3BO_3	6,2	Гидролизат казеина (энзиматический)	1000
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Кинетин	1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	Ауксин (β -индолилуксусная или α -нафтилуксусная кислота)	1
KJ	0,83		

Несмотря на это, кинетика роста культуры клеток растений, как и роста микроорганизмов, графически изображается сходной кривой роста со всеми характерными участками (фазами). Если концентрация всех компонентов питательной среды оптимальна и в течение культивирования поддерживается на неизменном уровне, имеет место преимущественное нарастание биомассы (первичный метаболизм). При недостаточном содержании в среде одного или нескольких компонентов (фаза замедленного роста, стационарная фаза) обычно начинает преобладать вторичный метаболизм, который в культуре растительных клеток проявляется преимущественно в накоплении в клеточных вакуолях метаболитов.

В производственных условиях применяют суспензионные (взвешенные в питательной среде) культуры клеток, выращиваемые путем глубокого культивирования в периодическом или проточном режиме при условии непрерывной аэрации питательной среды. Регуляция процесса выращивания растительных клеток обычно осуществляется по принципу хемостата. Для этого питательная среда лимитируется по одному из важных для роста факторов (азоту, фосфору, сахару), что способствует переключению клеточного метаболизма на синтез вторичных продуктов, ради которых и ведется культивирование растительных клеток.

Сложной проблемой продолжает оставаться извлечение метаболитов из перегруженных ими клеток без разрушения последних. Определенные надежды на успешное разрешение этой проблемы дают исследования в области управления транслокацией веществ через ЦПМ микроорганизмов, хотя они посвящены преимущественно экскреции белковых веществ, а не метаболитов небелковой природы.

Таким образом, задачи управления функционированием растительных клеток в культуре имеют много общего с управлением микроорганизмами, с учетом определенных особенностей. Одной из них является предварительное дедифференцирование растительных клеток, получение каллуса. В остальном же стратегия управления у них сходная: через изменение структуры генома, включая генно-инженерные методы, и путем воздействия на клетки через условия культивирования (состав питательной среды, концентрацию лимитирующих компонентов, температуру, рН среды, условия перемешивания, аэрацию и др). Специфическим для многоклеточных организмов управляющим фактором являются фитогормоны, которые обладают фазоспецифическим действием на митотический цикл. Так, ауксин выступает в качестве индуктора клеточного деления в пресинтетический период, гиббереллин - в постсинтетический период. Полагают, что гормон лишь запускает какую-то первичную реакцию в цепи реакций митотического цикла, а не действует на всем его протяжении [82].

§ 3. Гибридизация соматических клеток растений

Наиболее эффективный традиционный метод получения гибридных растений основан на половой гибридизации, возможности которой обычно ограничиваются лишь близкородственным, в пределах вида, скрещиванием. Это связано с наличием различных природных механизмов, препятствующих “размыванию” видов. С другой стороны, для удовлетворения практических потребностей людей представляется важным получение отдаленных гибридов, которые традиционными методами получить невозможно. Преодолеть сексуальную несовместимость растений позволяет гибридизация соматических клеток растений (парасексуальная гибридизация). Гибридная соматическая клетка сохраняет тотипотентность и в определенных условиях может дать гибридное растение.

Гибридизация соматических клеток осуществляется путем их слияния, которому препятствует жесткая клеточная стенка. К слиянию способны растительные клетки, освобожденные от клеточной стенки, которые называются протопластами. В качестве исходного материала для протопластирования (получения протопластов) могут быть использованы как ткани органов растения (например, листьев), так и клеточные культуры. Наиболее эффективным способом разрушения клеточной стенки является ферментативное расщепление ее с помощью пектиназы или смеси ее с целлюлазой. Протопласты сохраняют внутреннюю структуру исходных клеток, их метаболизм, способность к делению, ресинтезу клеточной стенки, дифференциации и воссозданию целого растения. Культивирование протопластов осуществляют в питательной среде, сходной с таковой для клеточных культур.

Спонтанное слияние протопластов происходит очень редко. Слияние протопластов индуцируют путем предварительной обработки их полиэтиленгликолем (ПЭГ) или поливиниловым спиртом (ПВС) и добавления после отмывки от этих реактивов ионов кальция. Более эффективно слияние протопластов происходит в переменном электрическом поле.

После слияния протопластов возможно последующее слияние ядер и образование гибридной клетки (гибрида). Если же после слияния протопластов одно из ядер дегенерирует, образуется цибрид, содержащий геном одной клетки, а цитоплазму обеих клеток. Возможен и промежуточный вариант, когда одно из ядер дегенерирует не полностью, а от него в новое ядро перейдет часть генома. В этом случае образуется асимметричный гибрид.

Технология искусственного слияния протопластов позволяет получать соматические гибриды из двух, трех и большего числа клеток раз-

ных видов. Более того, были получены гибридные клетки путем слияния клеток цветковых и низших растений и даже клетки животного с клеткой растения. Практическая ценность таких экзотических гибридов, по крайней мере в настоящее время, сомнительна; их получение лишь демонстрирует универсальный характер разработанной технологии слияния. Практическую значимость имеет гибридизация клеток относительно близких в таксономическом отношении растений.

Новая технология получения соматических гибридов не только расширила комбинативные возможности селекционера. Она во много раз ускорила сам процесс выведения гибридных растений с нужными свойствами, прежде всего за счет отбора гибридов уже на стадии гибридных клеток, не дожидаясь получения из них взрослых растений. Дело в том, что многие особенности будущего растения проявляются уже на клеточном уровне (устойчивость к различным заболеваниям, гербицидам, повышенной солености среды, разным значениям pH, температуры, способность накапливать полезные вещества и т.д.). Создавая соответствующий селективный фон, можно среди большого количества клеток выявить экзemplяры клеток с полезными свойствами.

Наряду со слиянием целых клеток растений ведутся работы и по конструированию клеточных систем из органелл, взятых у различных клеток. Например, можно получить реконструированную клетку путем объединения цитоплазмы (цитопласта) одной клетки с ядром (кариопластом) другой [83].

Рассмотренные методы управления генетическим аппаратом растительных клеток путем перестройки его структуры радикально изменяют многие свойства получаемых из них растений. В то же время их использование представляет пример той ситуации, когда экспериментальные возможности метода опережают теоретическое осмысление процессов, которые протекают в клеточных химерах, получаемых при объединении под одной цитоплазматической мембраной (тоже смешанной) двух сложнейших клеточных систем. Хотя объединяемые эукариотические клетки обладают сходным набором органелл и в них протекают близкие по сути биохимические процессы, они тем не менее представляют собой разные индивидуальные доселе автономно существовавшие системы, принадлежавшие таксономически различным растениям. Поэтому осмысленное, эффективное управление такими системами невозможно без глубокой научной проработки эмпирических методов клеточной инженерии.

§ 4. Культивирование клеток животных и управление им

Культивирование клеток и тканей животных связано с решением преимущественно медицинских проблем. Первые работы в этой области были выполнены на границе XIX и XX веков. Серьезный вклад в разработку методов культивирования клеток и тканей животных внесли Каррель (лауреат Нобелевской премии в области экспериментальной хирургии), Гаррисон, Эрл, Фелл. Последний ввел в практику органную культуру. Создание современных питательных сред связано с именами Фишера, Паркера, Хили, Моргана, Уэймаута (Вэймаута), Игла и др.

Первоначально культуры тканей использовали для размножения вирусов с целью диагностики и получения вакцин. Затем были получены культуры клеток фибробластов человека и мыши, способные продуцировать интерферон, β -клеток поджелудочной железы, способные вырабатывать инсулин. Однако в связи с успешным развитием методов генетической инженерии интенсивность работ по культивированию животных клеток - продуцентов биологически активных соединений снизилась. Был внедрен в клиническую практику инсулин, полученный с помощью *E.coli*, трансформированной плазмидой со встроенным в них геном инсулина человека. То же можно сказать в отношении гормона роста, интерферона и ряда других соединений. Тем не менее, бактериальные клетки не всегда способны полностью воспроизвести структуру синтезируемых чужеродных белков. В частности, это касается гликозилирования интерферонов, неоднозначной пространственной сборки чужеродных белковых молекул в клетках бактерий. Поэтому работы по поиску экономичных путей культивирования клеток человека и животных с целью производства медицинских препаратов продолжаются [74, 80].

Источником при получении культур тканей являются эмбрионы и взрослые животные. Наиболее доступны эмбриональные ткани цыпленка, мыши и человека. Часто ткани взрослых животных выращивать значительно труднее, чем ткани молодых. Наблюдается более длительная лаг-фаза. В определенной мере эти различия связаны с количеством межклеточного вещества соединительной ткани. Однако затем скорость роста и общие свойства клеток, полученных от эмбриональных и зрелых тканей, становятся неотличимыми друг от друга.

Классическими примерами зрелых тканей для культивирования являются центральная нервная система, подкожные фибробласты, костный мозг, лимфатические, эпителиальные ткани, почки, амнион, клетки периферической крови, опухоль и др.

Отбор тканей и последующие процедуры культивирования осуществляются в строго асептических условиях.

Свежеизолированные из организма ткани проходят этап первичной эксплантации - культивирования на предметных стеклах с лунками (в "висячей" капле), во флаконах Карреля или вращающихся пробирках различных типов.

Для получения суспензии клеток с целью их последующего культивирования ткани подвергают дезинтеграции. В ряде случаев эмбриональные ткани могут быть дезинтегрированы механическим путем, однако наиболее распространенными являются энзиматическое расщепление связующих клетки веществ и обработка реагентами, связывающими двухвалентные ионы. Среди энзимов наибольшее распространение получили трипсин, коллагеназа, эластаза, панкреатин, папаин. К веществам, связывающим двухвалентные ионы кальция и магния, относятся цитрат и ЭДТА.

Культуры клеток периодически пересевают на свежую питательную среду. Из них получают чистые штаммы путем выращивания в чашках Петри клонов - потомков, одиночных клеток. Обычно считается, что если клетки в течение 12-20 поколений сохраняются без каких-либо изменений, то они способны жить неопределенно долго и могут быть названы штаммом [84].

Важнейшим условием успешного выращивания тканей и клеток является подходящий для них состав питательной среды. Последние подразделяют на естественные (плазма крови, плацентарная сыворотка, амниотическая, асцитическая и плевральная жидкости, стекловидное тело, тканевые экстракты и др.) и среды определенного состава, которые составлены из десятков компонент известного химического состава. В частности, широко известная среда 199 имеет следующий состав (мг/л) [85]:

Аминокислоты (L-ряда)

Аланин - 25,0
Аргинин (гидрохлорид) - 70,0
Аспарагиновая кислота - 30,0
Цистин - 20,0
Глутаминовая кислота - 75,0
Глутамин - 100,0
Глицин - 50,0
Гистидин (гидрохлорид) - 20,0
Оксипролин - 10,0
Изолейцин - 20,0
Лейцин - 60,0
Лизин - 70,0
Метионин - 15,0
Фенилаланин - 25,0
Пролин - 40,0
Серин - 25,0
Треонин - 30,0
Триптофан - 10,0
Тирозин - 40,0
Валин - 25,0

Витамины

n-Аминобензойная кислота - 0,05
Биотин - 0,01
Пантотенат кальция - 0,01
Холинхлорид - 0,5
Фолиевая кислота - 0,01
Инозитол - 0,05
Ниацин - 0,025
Никотинамид - 0,025
Пиридоксаль (гидрохлорид) - 0,025
Пиридоксин (гидрохлорид) - 0,025
Рибофлавин - 0,01
Тиамин (гидрохлорид) - 0,01
Витамин А - 0,10

Витамин D - 0,10
Витамин Е - 0,10
Витамин К - 0,01

АТФ - 10**Восстановители**

Аскорбиновая к-та - 0,05
L-цистеин (гидрохлорид) - 0,1
Глутатион - 0,05

Предшественники**нуклеиновых кислот**

Аденин - 10,0
Гуанин - 0,3
Гипоксантин - 0,3
Тимин - 0,3
Урацил - 0,3
Ксантин - 0,3
Адениловая кислота - 0,2

Источники липидов

Холестерин - 0,2
Твин 80 - 5,0

Источники углеводов

(кроме глюкозы)
2-дезоксид-Д-рибоза - 0,5
Д-рибоза - 0,5
Ацетат натрия - 50,0

Соли

NaCl - 6800,0
KCl - 400,0
CaCl₂ - 200,0
MgSO₄ · 7H₂O - 200,0
NaH₂PO₄ - 140,0
NaHCO₃ - 2200,0
Fe(NO₃)₃ · 9H₂O - 0,1
Глюкоза - 1000,0

Эта бессывороточная среда используется как поддерживающая среда, предназначенная главным образом для сохранения клеточных культур в хорошем состоянии в течение нескольких недель, при этом свойства клеток должны оставаться неизменными. После добавле-

ния к ней сыворотки среда 199 может быть использована как ростовая, обеспечивающая быстрое наращивание биомассы [85].

Для получения большого количества клеток наиболее пригодна суспензионная культура. Различные линии клеток (линия - культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки) отличаются по способности к росту в суспензии. Для тех из них, которые обладают потенциальной возможностью к такому росту, существуют два основных способа перевода растущих на субстрате клеток в линии клеток, культивируемых в суспензии, - отбор и адаптация. В основе обоих способов лежит повторяемый несколько раз отбор клеток, переходящих из прикрепленного состояния в свободное после легкого соскребания, или осторожного покачивания культуральной среды (отбор), или механического перемешивания суспензии (адаптация) [87]. Разновидностью суспензионного культивирования является монослойное культивирование на поверхности микроносителей, которые представляют собой мелкие сферические гранулы диаметром 0,1-0,3 мм и удельным весом 1,03-1,05 г/см³, изготовленные из сефадекса, коллагена, полиакриламида, полистирола или другого материала. Оно позволяет выращивать монослойные культуры в суспензионных условиях. Культуры с микроносителями в промышленности используются для получения вакцин и интерферона [87].

Для всех видов культур (монослойных, суспензионных, на микроносителях) в условиях периодического культивирования обычно характерны типичные для микроорганизмов кинетика и кривая роста. В начале культивирования клеток наступает лаг-период (включающий лаг-фазу и фазу ускорения роста), который длится от нескольких часов до нескольких дней. Лаг-период сменяется фазой логарифмического роста с постоянным временем удвоения числа клеток популяции каждые 15-20 часов (в быстрорастущей культуре). Затем следуют фаза замедленного роста, стационарная фаза и фаза отмирания клеток. Основными факторами, определяющими описанный характер кривой роста, являются концентрации компонентов питательной среды и накапливающихся в ней продуктов обмена веществ, оказывающих тормозящее действие на рост клеток. При проточном культивировании эти концентрации регулируются оператором путем изменения их исходных значений для поступающей в ферментатор питательной среды и скорости ее поступления (скорости разбавления). Оптимальное значение pH для клеток млекопитающих лежит в диапазоне 7,2-7,4. Оно поддерживается с помощью буферной системы. При отклонении pH в ту или другую сторону от оптимального значения снижается скорость роста. Осмотическое давление также

влияет на скорость роста; для большинства клеток оптимум осмотического давления соответствует наблюдаемому в организме животного. С увеличением температуры скорость роста клеток повышается до определенного (оптимального) значения, которое для тканей млекопитающих и птиц равно приблизительно $37,5^{\circ}$. Дальнейшее повышение температуры ведет к резкому снижению скорости роста. Важным фактором, влияющим на скорость роста, является концентрация кислорода в среде. Кислород растворяется в культуральной среде до определенного предела ($7,6$ мкг/мл), а средняя скорость его потребления составляет 6 мкг/ 10^6 клеток в час. Это ведет к быстрому истощению кислорода, поэтому его концентрация может стать лимитирующей и с помощью нее можно управлять скоростью роста клеточной популяции. Определенное влияние на рост оказывает плотность клеточной популяции. Высокая плотность снижает удельную скорость роста. В определенных условиях стимулирующее рост действие оказывают некоторые гормоны (инсулин, тироксин, трийодуксусная кислота).

§ 5. Фазозависимый характер управления клеткой

Делящиеся клетки как растений, так и животных в период между делениями претерпевают серию последовательных изменений, которые образуют так называемый клеточный цикл, или жизненный цикл клетки (рис. 3.1). Он состоит из митоза (М) и интерфазы.

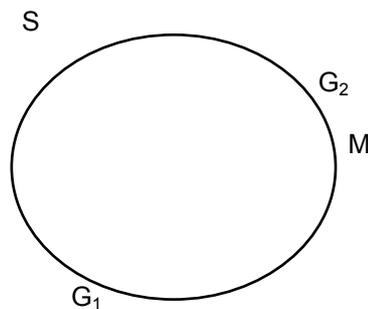


Рис. 3.1. Жизненный цикл клетки

Последняя включает три последовательно протекающих периода (их в литературе часто называют фазами): пресинтетический (G₁),

синтетический (S) и постсинтетический (G_2). После митоза (который сам подразделяется на профазу, метафазу, анафазу и телофазу) дочерняя клетка содержит диплоидный набор хромосом и сразу же начинает готовиться к удвоению их числа. В период G_1 наряду с белками, необходимыми для выполнения специализированной клеткой ее функций в организме, происходит образование большого набора белковых молекул и трифосфатов нуклеозидов, необходимых для синтеза ДНК. За разнообразие биохимических процессов этот период еще называют гетеросинтетической интерфазой. По продолжительности G_1 самый большой и самый чувствительный в отношении внешних воздействий. В период S ведущим процессом является репликация ДНК. За ним следует период G_2 , который называют также премитотическим, поскольку он не только предшествует митозу, но и связан с подготовкой клетки к делению. По продолжительности интерфаза занимает не менее 90% общей длительности жизненного цикла клетки. Для большинства клеток млекопитающих при росте *in vitro* продолжительность цикла составляет примерно 20 ч, при этом периоды G_1 , S, G_2 и M делятся соответственно 8,6,5 и 1 ч [88].

В отношении упорядоченности протекания различных биохимических процессов в жизненном цикле клетки был сделан ряд важных выводов [88]:

- ядерная ДНК реплицируется в фазе S и репарируется в остальные периоды жизненного цикла (правило “или репликация, или репарация”);
- митохондриальная ДНК реплицируется в фазах S и G_2 ;
- метилирование старых цепей ядерной ДНК происходит одновременно с синтезом новых цепей ДНК в фазе S;
- рибосомальная РНК, составляющая 80% всей РНК, синтезируется главным образом в фазе G_1 (правило “или ДНК, или РНК”), а подвергается процессингу в фазе G_2 (правило “или синтез рРНК, или ее созревание”);
- синтез белков происходит в фазах G_1 и G_2 и резко снижен в фазе S (правила “или ДНК, или белок” и “когда РНК, тогда и белок”).

Учет временной упорядоченности протекания биохимических процессов в клетке позволил установить причины максимальной радиочувствительности биосинтеза ДНК на границе G_1 - S и клеточного деления - в G_2 . Однако он позволяет не только объяснять факты, но и планировать целенаправленные воздействия, позволяющие оптимальным путем получать намеченный результат. В качестве примера можно привести схему, отражающую “точки приложения” веществ с фазоспецифическим действием при полихимиотерапии опухоли (рис. 3.2). По-видимому, использование веществ, действующих на опреде-

ленные периоды жизненного цикла клетки, было бы более эффективным, если бы оно сочеталось с синхронизацией клеточных делений в опухоли с помощью синхронизирующих агентов [88].

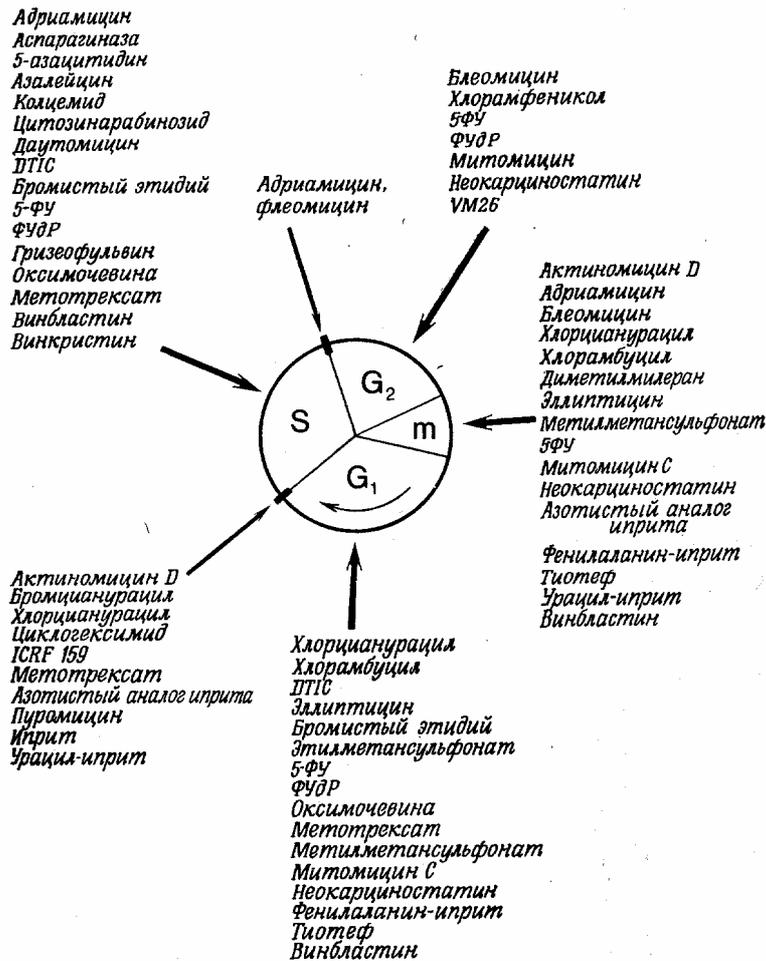


Рис. 3.2. Классификация веществ с фазоспецифическим действием, которые можно было бы использовать для полихимиотерапии опухолей [89]

§ 6. Гибридизация соматических клеток животных

В 1960 г. Барски с сотр. (Франция) обнаружили, что при совместном культивировании двух линий опухолевых клеток мыши образуется новый тип клеток. Их ядра содержат число хромосом, равное сумме хромосом родительских (исходных) клеток. Более того, в новых клетках были обнаружены маркеры родительских клеток. Все это свидетельствовало о том, что новые клетки образовались путем спонтанного слияния родительских клеток, которое происходит с очень низкой частотой. Для повышения ее в последующих опытах был использован инактивированный вирус Сендай, вирион которого покрыт липидсодержащей оболочкой, сливающейся с мембраной клетки-хозяина в момент проникновения в нее. Инактивированный вирус способствовал слиянию клеток, одновременно связываясь с их мембранами. В опытах по слиянию клеток также использовались ПЭГ, ионы кальция, лизолецитин. В настоящее время, как и в случае со слиянием протопластов, применяют метод электрослияния (электрошока), которое можно осуществить в монослое, суспензии и осадке после центрифугирования [90]. Осуществить слияние и получить гибриды клеток животных методически проще, чем в случае микроорганизмов или растений, так как клетки животных не имеют клеточной стенки, которую необходимо разрушать перед слиянием.

С помощью индуцированного тем или иным способом слияния могут быть получены гибридные клетки, содержащие два ядра и более. Такие клетки (гетерокарионы) при благоприятных условиях могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких недель, однако способность к репродукции зависит от образования одноядерных дочерних клеток. Объединение ядер гетерокариона в одно крупное ядро происходит во время митоза. Образующиеся одноядерные гибридные клетки синтезируют белок, РНК, ДНК, часто способны к неограниченному размножению. Анализ метафазных пластинок показал, что соотношение хромосом обоих родителей в гибридных клетках бывает разным. Результаты исследований свидетельствуют о том, что клетки самых разных видов позвоночных при слиянии вполне совместимы друг с другом. По-видимому, у них нет внутриклеточных механизмов для распознавания чужого, причем к такому бесконфликтному объединению способны как цитоплазма, так и ядро. Функции родительских клеток в гибридной клетке полностью интегрируются [91].

Образование гибридных клеток (гибридом) животных позволяет объединить полезные свойства двух и большего числа исходных клеток, получить не существующие в природе искусственные типы клеток. Одним из нашедших практическое применение примеров

использования гибридом является получение моноклональных антител.

§ 7. Получение моноклональных антител

Неисчислимо количество веществ различной химической природы при попадании в организм способны вызывать развитие специфических иммунологических реакций. Эти генетически чужеродные вещества (антигены, АГ) индуцируют образование лимфоцитами антител (АТ) - веществ гликопротеиновой природы, обладающих способностью вступать в реакцию с соответствующими антигенами и образовывать комплекс. Последний может выпасть в осадок (реакция преципитации), вызвать склеивание (агглютинацию) или лизис клеток.

Антитела вырабатываются на определенную группу атомов в молекуле АГ (антигенную детерминанту, АД). В молекуле АГ их может быть несколько, поэтому соответственно возможно образование лимфоцитами нескольких видов АТ. По современным данным, разнообразие АТ оценивается ориентировочной величиной 10^7 . В сыворотке крови здорового человека содержится смесь множества АТ, обладающих высокой специфичностью и представленных по отдельности очень низкими концентрациями. Гетерогенность состава АТ обусловлена гетерогенностью популяции лимфоцитов, каждый из которых способен вырабатывать только один вид АТ. Получение индивидуальных АТ в достаточно больших количествах до недавнего времени не представлялось возможным.

Решить проблему удалось Д. Келеру и Ц. Милстейну, предложившим в 1975 г. метод получения гомогенных антител, за который в 1984 г. они были удостоены Нобелевской премии. Этот метод включает несколько основных этапов: иммунизацию животного; слияние В-лимфоцитов иммунизированных доноров с клетками миеломы; отбор клонов, продуцирующих специфические антитела; клонирование отобранных клонов; выделение индивидуальных (моноклональных) антител (МонАТ). Конкретные методы, используемые разными авторами, в деталях отличаются [86, 90].

Цель иммунизации - индукция клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела к определенному антигену, который путем инъекции вводится в организм животного. Источником В-лимфоцитов, как правило, служит селезенка иммунизированного животного (обычно мыши или крысы), из которой по истечении определенного срока отбирают суспензию клеток (спленоцитов).

Вторым партнером при образовании гибридом являются определенные линии миеломных (опухолевых) клеток (обычно того же вида, что и иммунизированное животное).

Слияние спленоцитов с миеломными клетками часто осуществляют путем кратковременной инкубации их в среде, содержащей ПЭГ.

После этого суспензию клеток в полной ростовой среде разливают в лунки планшетов и через некоторое время после посева в лунки добавляют селективную среду ГАТ (содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин), в которой остаются жизнеспособными только гибридные (слившиеся) клетки. Миеломные клетки передают гибридомам способность к неограниченному размножению.

При достижении в лунках достаточной плотности клеток осуществляют тестирование их на продукцию специфических антител. Для этой цели часто используют иммуноферментный метод (ИФМ). В лунках, показавших положительную реакцию на специфическое антитело, могут быть и гибридомы, вырабатывающие другие антитела. Разделение гетерогенных смесей гибридом на отдельные виды обычно осуществляют методом лимитирующего разведения, в результате которого под контролем ИФМ отбирают достаточное для массового клонирования количество гибридом, вырабатывающих только специфическое антитело.

Массовое размножение отобранных клонов с целью получения МонАТ осуществляют *in vitro* (в стационарной, роллерной культуре, либо в различного рода ферментаторах) или *in vivo*. В последнем случае берутся животные, идентичные с гибридомами по антигенам гистосовместимости. Суспензию гибридомных клеток инъецируют внутривентриально. За 1-2 недели до этого часто осуществляют внутривентриальную инъекцию пристана или вазелина, которые способствуют образованию асцита (скопления жидкости в брюшной полости). Гибридомы образуют опухоли и при этом выделяют в асцитную жидкость антитела. Асцитная жидкость периодически забирается с помощью иглы. Для получения последней порции асцитной жидкости животное забивают.

Затем осуществляют выделение и очистку МонАТ. Одним из способов выделения чистых МонАТ является иммуносорбция на сорбенте (обычно сахарозе), с которым ковалентно сшит соответствующий АГ. При культивировании гибридомных клеток *in vitro*, особенно при использовании бессывороточных сред, процедура очистки МонАТ существенно облегчается.

МонАТ используются для целей медицинской диагностики, эффективного лечения многих заболеваний и в качестве высокоспеци-

фических химических реактивов. Очень перспективно применение их для раннего обнаружения онкологических заболеваний и лечения опухолей с помощью иммунотоксинов. Последние представляют собой комплексы между молекулами МонАТ, специфичных для опухолевых клеток, и субъединицами белковых ядов, например, рицина - белка, выделяемого из семян клещевины. Этот белок состоит из двух субъединиц - А и В, соединенных между собой дисульфидной связью. Субъединица А, попав в цитоплазму, необратимо ингибирует белковый синтез клетки, тем самым убивает ее. Выделенную из рицина субъединицу А ковалентно соединяли с молекулой МонАТ, специфичной к АГ опухолевой клетки. После введения в организм этот комплекс избирательно связывается с поверхностью опухолевой клетки и в конечном счете оказывается "втянутым" внутрь ее. Субъединица А в цитоплазме высвобождается и убивает клетку. МонАТ в этом случае осуществляет направленную доставку токсина только к опухолевым клеткам [74].

В случае с МонАТ основными точками приложения управляющих воздействий является химическая природа АД и в целом антигена, а также вид иммунизированного животного, от которых зависит спектр вырабатываемых антител. Последнее обстоятельство поставило проблему получения МонАТ человеческого происхождения, которые, в отличие от соответствующих МонАТ животных, не являются чужеродными белками для человека и не вызывают при их введении в его организм реакции трансплантат против хозяина. Эта проблема решается путем разработки способов иммунизации вне организма и получения стабильных антителообразующих линий человека, в частности, с помощью обработки В-лимфоцитов человека вирусом Эпштейна - Барр, который трансформирует лимфоциты, делая их способными бесконечно размножаться [86].

Кроме того, имеется большое количество точек приложения управляющих воздействий, связанных с технологическими операциями (слиянием спленоцитов и миеломных клеток, отбором клонов, их клонированием и др.).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Коган А.Б., Наумов Н.П., Режабек Б.Г., Чораян О.Г. Биологическая кибернетика. М.: Высшая школа, 1977. - 408 с.
2. Энгельгардт В.А. О некоторых атрибутах жизни: иерархия, интеграция, "узнавание" // Вопросы философии. 1976. №7. С. 65-81.
3. Фролов Ю.П. О возможных механизмах дистантных взаимодействий в биологических системах. Деп. в ВИНТИ, № 2909-В95, 1995. - 7с.
4. Гурвич А.Г. Теория биологического поля. М.: Советская наука, 1944.
5. Чижевский А.Л. Земное эхо солнечных бурь. М.: Мысль, 1976. - 367 с.
6. Казначеев В.П., Михайлова Л.П. Биоинформационная функция естественных электромагнитных полей. Новосибирск: Наука, 1985. -144 с.
7. Каньчжэн Ц. Биоэлектромагнитное поле - материальный носитель био-генетической информации // Аура - Z, 1993. № 3. С. 42-52.
8. Гаряев П.П. Волновой геном. М.: Общественная польза, 1994. - 279 с.
9. Гаряев П.П. Волновой генетический код. М.: Ин-т проблем управления РАН, 1997. - 108 с.
10. Лупичев Н.Л. Электростимуляция, гомеотерапия и феномен дальнего действия. М.: Ириус, 1990. - 136 с.
11. Шноль С.Э. Конформационные колебания макромолекул // Колебательные процессы в биологических и химических системах. М.: Наука, 1967. С. 22-40.
12. Чиркова Э.Н. Волновая природа регуляции генной активности. Живая клетка как фотонная вычислительная машина //Успехи соврем. биологии. 1994. Т.114. Вып. 6. С. 659-678.
13. Георгиев Г.П. Гены высших организмов и их экспрессия. М.: Наука, 1989. - 255 с.
14. Фриш С.Э., Тиморева А.В. Курс общей физики. Т. 2. М.: Гостехиздат, 1953. - 504 с.
15. Мизун Ю.Г. Космос и здоровье. М.: Вече, АСТ, 1997. - 608 с.
16. Девидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1976. - 412 с.
17. Фролов Ю.П. Неконтактное действие бензоидных соединений на биологические системы. Самара: Изд-во "Самарский университет", 2000.
18. Фролов Ю.П. Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 1. Молекулы и клетки. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1992. - 428 с.
19. Гудвин Б. Временная организация клетки. М.: Мир, 1966. - 251 с.
20. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов. М.: Мир, 1979. - 287 с.
21. Смит Дж. Математические идеи в биологии. М.: Мир, 1970. - 179 с.
22. Бродский В.Я., Нечаева Н.В. Ритм синтеза белка. М.: Наука, 1988. - 240 с.
23. Доман М.Г., Феденко Е.П. Биологическая роль циклического АМФ // Успехи биологической химии. Т. 17. М.: Наука, 1976. С. 63-101.

24. Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты. М.: Медицина, 1979. - 510 с.
25. Уголев А.М., Ратбиль О.С. Гормоны пищеварительной системы: Физиология, патология, теория функциональных блоков. М.: Наука, 1995. - 283 с.
26. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. М.: Изд-во МГУ, 1983. - 256 с.
27. Нестерова М.В., Соломония Р.О., Северин Е.С. Циклические нуклеотиды в регуляции процессов клеточного деления // Успехи биологической химии. Т. 22. М.: Наука, 1982. С. 63-75.
28. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Покровский Б.В., Протасова Т.Н. Циклические нуклеотиды как внутриклеточные передатчики действия гормонов // Усп. совр. биологии. Т. 80. Вып. 3(6), 1975. С. 351-370.
29. Серых М.М. Современные представления о механизмах действия гормонов. Куйбышев: Изд-во "Куйбыш. университет", 1980. - 56 с.
30. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1989. - 495 с.
31. Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке М.: Наука, 1969. - 440 с.
32. Стайер Л. Биохимия. Т.2. М.: Мир, 1985. - 312 с.
33. Кребс Г., Корнберг Г. Превращения энергии в живых системах. М.: ИЛ, 1959. - 140 с.
34. Скулачев В.П. Аденозинтрифосфат и трансмембранный потенциал ионов водорода - две конвертируемые и транспортабельные формы энергии в живой клетке // Усп. совр. биологии. Т. 84. Вып. 2(5), 1977. С. 165-175.
35. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977.
36. Сакс В.А. Внутриклеточный транспорт энергии: Фосфокреатиновый путь // Успехи биологической химии. Т. 24. М.: Наука, 1983. С. 40-64.
37. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 1. Харьков: Торсинг, 1998. - 560 с.
38. Четверин А.Б., Спиринов А.С. Биоэнергетика и синтез белка // Успехи биологической химии. Т.24. М.: Наука, 1983. С. 3-39.
39. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 2. М.: Мир, 1986. - 312 с.
40. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979. - 151 с.
41. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. М.: Мир, 1987. - 118 с.
42. Кагава Я. Биомембраны. М.: Высшая школа, 1985. - 303 с.
43. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. - 567 с.
44. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Изд-во МГУ, 1985. - 376 с.
45. Федоров М.В. Микробиология. М.: Сельхозиздат, 1963. - 448 с.
46. Пяткин К.Д. Микробиология. М.: Медицина, 1971. - 352 с.
47. Горбунова Н.П., Ключникова Е.С., Комарницкий Н.А. и др. Малый практикум по низшим растениям. М.: Высшая школа, 1967. - 236 с.
48. Биологический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия, 1986. - 832 с.
49. Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1981. - 606 с.
50. Заварзин А.А., Харазова А.Д. Основы общей цитологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. - 240 с.

51. Чурбанова И.Н. Микробиология. М.: Высшая школа, 1987. - 239 с.
52. Реннеберг Р., Реннеберг И. От пекарни до биофабрики. М.: Мир, 1991. - 112 с.
53. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. - 332 с.
54. Andrews J.F. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates // Biotech. Bioeng., 1968. V.10, P. 707.
55. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.Д. Биотехнология. Кинетические основы метаболических процессов. М.: Высшая школа, 1990. - 296 с.
56. Ryder D.N., Sinclair C.G. Model for the growth of aerobic microorganisms under oxygen limiting conditions // Biotechnology and Bioengineering, 1972. V. 14.
57. Физиологическая регуляция метаболизма дрожжей/ Под ред. М.В. Заляшко. Минск: Наука и техника, 1991. - 332 с.
58. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Т. 1. М.: Мир, 1989. - 692 с.
59. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Новосибирск: Наука, 1980. - 136 с.
60. Рубин Л.Б. Свет и развитие низших организмов. М.: Знание, 1975. - 64 с.
61. Опарин А.И. Возникновение жизни на Земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957. - 598 с.
62. Ленинджер А. Основы биохимии. Т.2. М.: Мир, 1985. - 368 с.
63. Рубин Б.А. Курс физиологии растений. М.: Высшая школа, 1963. - 598 с.
64. Ничипорович А.А. Рабочее совещание по вопросам измерения оптического излучения для целей физиологии и экологии растений // Физиол. раст., 1960. Т.7. Вып. 6. С. 744-747.
65. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. - 310 с.
66. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высшая школа, 1988. - 208 с. (Книга 2 из серии "Биотехнология" из 8 книг).
67. Волова Т.Г., Окладников Ю.Н., Сидько Ф.Я. и др. Производство белка на водоросле. Новосибирск: Наука, 1981. - 150 с.
68. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. - 815 с.
69. Голдовский А.М. Анабиоз и его практическое значение. Л.: Наука, 1986. - 169 с.
70. Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Л.: Наука, 1972. - 288 с.
71. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. Киев: Наукова думка, 1975. - 343 с.
72. Людковская Р.Г., Бурмистров Ю.М. Фотобиоэлектрические процессы в возбудимых клетках // Биофизика живой клетки. Пущино: Ин-т биофизики АН СССР, 1971. С. 50-67.
73. Бич Г., Бест Д., Брайерли К. и др. Биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 1988. - 480 с.
74. Биотехнология / Под ред. А.А. Баева М.: Наука, 1984. - 309 с.
75. Итоги науки и техники. / Серия Биотехнология. Т. 22. Несмеянова М.А. Молекулярные механизмы секреции белков у бактерий. М.: ВИНТИ, 1990. - 184 с.

76. Жданов В.М. Эволюция вирусов. М.: Медицина, 1990. - 376 с.
77. Соловьев В.Д., Баландин И.Г. Клетка и вирус. М.: Медицина, 1973. - 192 с.
78. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 3. М.: Мир, 1985. - 320 с.
79. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 1. М.: Мир, 1986. - 223 с.
80. Сассон А. Биотехнология: Сверхшения и надежды. М.: Мир, 1987. - 411 с.
81. Артамонов В.И. Биотехнология - агропромышленному комплексу. М.: Наука, 1989. - 160 с.
82. Гамбург К.З. Фитогормоны и клетки. М.: Наука, 1970. - 104 с.
83. Зеленин А.В., Куц А.А., Прудовский И.А. Реконструированная клетка. М.: Наука, 1982. - 207 с.
84. Пол Д. Культура клеток и тканей. М.: Медгиз, 1963. - 347 с.
85. Новые методы культуры животных тканей. М.: Мир, 1976. - 255 с.
86. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф. и др. Клеточная инженерия. М.: Высшая школа, 1987. - 127 с. (Книга 3 из серии "Биотехнология" из 8 книг).
87. Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, 1989. - 333 с.
88. Вольпе П. Биохимия клеточного цикла. М.: Мир, 1979. - 95 с.
89. Hill В.Т., Baserga R. The cell cycle and its significance for cancer treatment // Cancer treatm. Res., 2, 1975. P. 159-175.
90. Методы культивирования клеток / Отв. ред. Г.П.Пинаев Л.: Наука, 1988. - 313 с.
91. Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М.: Мир, 1973. - 190 с.
92. Фролов Ю.П. Управление биологическими системами. Молекулярный уровень. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1999. - 108 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Глава первая. Общие вопросы управления клеткой	5
§1. Клетка как объект управления	5
§2. Практические задачи цитобиокибернетики	7
§3. Структурная организация потоков вещества, энергии и информации в клетке	8
§4. Поток информации в клетке и его регуляция (на примере биосинтеза белка)	17
§5. Управление биосинтезом белка	33
§6. Поток энергии в живых системах и управление им	37
§7. Поток вещества и его регуляция	50
Глава вторая. Управление одноклеточными организмами	57
§1. Систематическое положение одноклеточных организмов	57
§2. Структурные и функциональные особенности одноклеточных организмов	58
§3. Практические задачи управления микроорганизмами	62
§4. Факторы, определяющие продуктивность микроорганизмов	64
§5. Управление скоростью образования биомассы субстратом	65
§6. Ингибирование роста микроорганизмов продуктами их жизнедеятельности	70
§7. Управление метаболизмом микробной клетки с помощью кислотности среды	72
§8. Управление метаболизмом микроорганизмов с помощью температуры	75
§9. Управление ростом фототрофных микроорганизмов с помощью светового потока	78
§10. Управление метаболизмом микробной клетки с помощью индукторов	84
§11. Управление функциями микроорганизмов путем изменения структуры генома	86
Глава третья. Управление культурами клеток многоклеточных организмов	94
§1. Структурные и функциональные особенности клеток многоклеточных организмов	94
§2. Культивирование растительных клеток	95
§3. Гибридизация соматических клеток растений	98
§4. Культивирование клеток животных и управление им	100
§5. Фазозависимый характер управления клеткой	104
§6. Гибридизация соматических клеток животных	107
§7. Получение моноклональных антител	108
Библиографический список	111

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Серых Милон Матвеевич - доктор биологических наук, профессор Самарской сельскохозяйственной академии, основатель и руководитель кафедры биохимии Самарского государственного университета (1971-1991 гг.). Автор свыше 100 научных публикаций.

Фролов Юрий Павлович - заведующий кафедрой биохимии Самарского государственного университета. Автор десятков статей, ряда монографий и учебных пособий.

В 2001 году издательство “Самарский университет”
выпустит книгу

**УПРАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ
ОРГАНИЗМЕННЫЙ УРОВЕНЬ**
(Под ред. Ю.П.Фролова)

Заказ направлять по адресу:

**443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1,
Самарский государственный университет,
кафедра биохимии**

В заявке необходимо указать банковские реквизиты заказчика

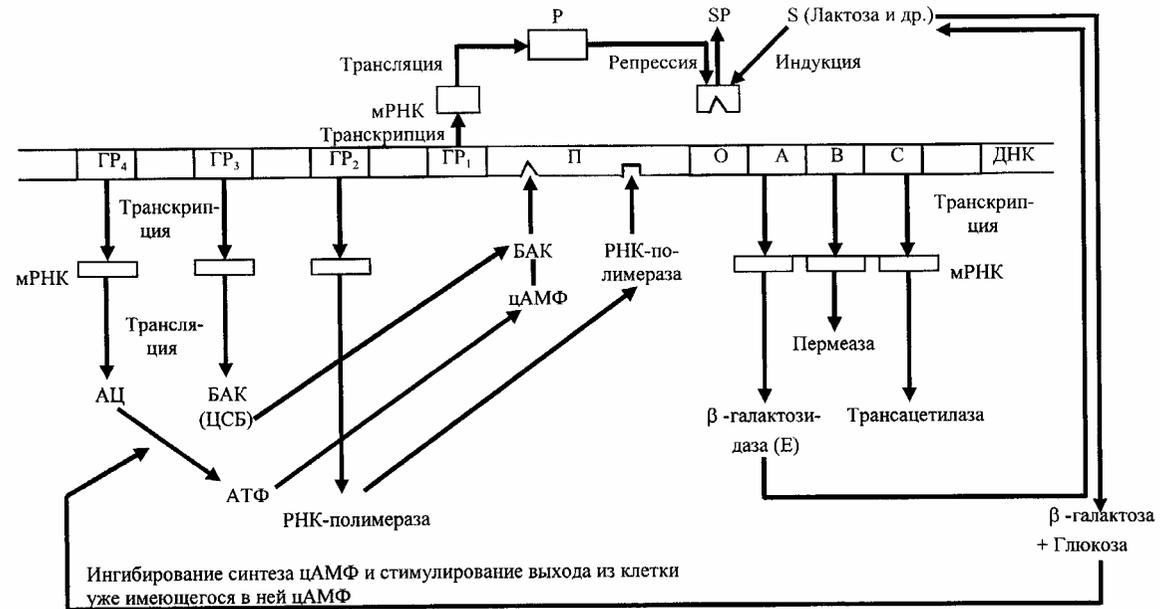


Рис. 1.3. Схема регуляции биосинтеза белка путем индукции и репрессии транскрипции в лактозном опероне у *E. coli* (по обзорам [23, 24]). Обозначения: П - промотор; О - оператор; А, В, С - структурные гены; S - субстрат; SP - комплекс субстрата с репрессором; P - репрессор, блокирующий оператор; БАК (ЦСБ) - белок активатор катаболизма (цикловсвязывающий белок); цАМФ - циклический АМФ; АЦ - аденилатциклаза

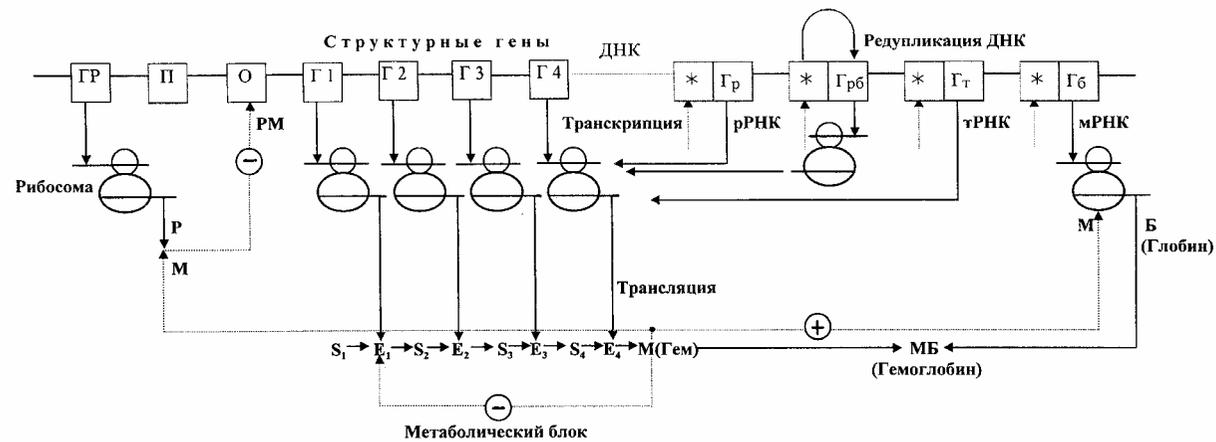


Рис. 1.6. Иерархические уровни регуляции биосинтеза белка в клетке. Обозначения: ГР - ген-регулятор; Р - белок-репрессор; РМ - комплекс белка-репрессора с метаболитом; П - промотор; О - оператор; Г1-Г4 - структурные гены; Г_р - гены рибосомных РНК; Г_{рб} - гены рибосомных белков; Г_т - гены транспортных РНК; Г_б - ген сложного белка; М - протетическая группа сложного белка; * - участок ДНК, регулирующий работу гена (включает ГР, П и О). Прерывистыми линиями со стрелками обозначены обратные связи