

LEHNINGER

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

Fifth Edition

David L. Nelson
Professor of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison

Michael M. Cox
Professor of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison



W. H. FREEMAN AND COMPANY
New York

III ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ

24 Гены и хромосомы 7

24.1. Элементы хромосом 7

Гены — это участки молекул ДНК, кодирующие полипептиды и молекулы РНК 8

Молекулы ДНК гораздо крупнее, чем клеточные или вирусные структуры, в которые они упакованы 9

Гены и хромосомы эукариот очень сложно организованы 12

Краткое содержание 15

24.2. Сверхспирализация ДНК 15

Большинство клеточных ДНК раскручены 17

Степень скручивания ДНК определяется топологическим параметром — порядком зацепления 18

Топоизомеразы катализируют изменение порядка зацепления в ДНК 21

Для компактной упаковки ДНК нужна особая форма сверхспирализации 23

Дополнение 24-1. Медицина. Лечение заболеваний путем ингибирования топоизомераз 24

Краткое содержание 26

24.3. Структура хромосом 27

Хроматин состоит из ДНК и белков 27

Гистоны — небольшие основные белки 28

Нуклеосомы — основные структурные единицы хроматина 28

Нуклеосомы образуют структуры с более сложной организацией 31

Дополнение 24-2. Медицина. Эпигенетика, структура нуклеосом и варианты гистонов 32

Структура конденсированных хромосом поддерживается SMC-белками 35

Бактериальная ДНК тоже сложно организована 36

Краткое содержание 37

Ключевые термины 38

Дополнительная литература для дальнейшего изучения 38

Вопросы и задачи 39

Анализ экспериментальных данных 41

25 Метаболизм ДНК 43

25.1. Репликация ДНК 45

Основные принципы репликации ДНК 45

ДНК разрушается нуклеазами 48

ДНК синтезируется 49

ДНК-полимеразами 49

Репликация — очень точный процесс 50

У *E. coli* не менее пяти ДНК-полимераз 52

В репликации ДНК участвует

множество ферментов

и белковых факторов 54

Репликация хромосомы *E. coli*

происходит постадийно 56

Репликация в эукариотических клетках

происходит по похожей схеме,

но сложнее 64

Вирусные ДНК-полимеразы являются

мишенями для противовирусной

терапии 66

Краткое содержание 66

25.2. Репарация ДНК 66

Онкологические заболевания связаны с мутациями 67

Все клетки имеют несколько систем репарации ДНК 68

Взаимодействие репликативных вилок

с повреждением в ДНК может

запустить подверженный ошибкам

синтез ДНК через повреждение 76

Дополнение 25-1. Медицина. Репарация ДНК и рак 79

Краткое содержание 80

25.3. Рекомбинация ДНК 81

Гомологичная генетическая рекомбинация выполняет

несколько функций 81

Рекомбинация в ходе мейоза

начинается с двухцепочечных

разрывов 84

В рекомбинации участвует множество

ферментов и других белков 85

Для репарации заблокированных

репликативных вилок

используются все возможности

метаболизма ДНК 89

Сайт-специфическая рекомбинация

приводит к точным

перестройкам ДНК 89

Для полной репликации хромосомы может потребоваться сайт-специфическая рекомбинация	93	Молекулы рРНК и тРНК также подвергаются процессингу	133
Подвижные генетические элементы перемещаются из одного участка ДНК в другой	94	РНК со специализированными функциями подвергаются различным вариантам процессинга	137
Сборка генов иммуноглобулинов происходит путем рекомбинации	95	Каталитические РНК осуществляют некоторые реакции метаболизма РНК	138
Краткое содержание	98	Ферментативные свойства интронов группы I	139
Ключевые термины	98	мРНК в клетке разрушаются с разной скоростью	142
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	98	Полинуклеотидфосфорилаза создает случайные РНК-подобные полимеры	142
Вопросы и задачи	100	Краткое содержание	143
Анализ экспериментальных данных	102		
<hr/>			
26 Метаболизм РНК	105	26.3. РНК-зависимый синтез РНК и ДНК	144
26.1. ДНК-зависимый синтез РНК	106	Обратная транскриптаза синтезирует ДНК с матрицы вирусной РНК	144
РНК синтезирует РНК-полимераза	108	Некоторые ретровирусы вызывают рак и СПИД	146
Синтез РНК начинается с промоторов	110	Дополнение 26-2. Медицина. Борьба со СПИДом с помощью ингибиторов обратной транскриптазы	147
Дополнение 26-1. Практическая биохимия. РНК-полимераза оставляет свой след на промоторе	111	Многие транспозоны, ретровирусы и интроны могут иметь общее эволюционное происхождение	148
Транскрипция регулируется на нескольких уровнях	115	Теломераза — специализированная обратная транскриптаза	148
Специфические последовательности подают сигнал прекращения синтеза РНК	116	Некоторые вирусные РНК реплицируются РНК-зависимой РНК-полимеразой	151
В клетках эукариот содержатся РНК-полимеразы трех типов	117	Синтез РНК открывает важный подход к изучению биохимической эволюции	151
Для проявления активности РНК-полимеразы II требуются другие белковые факторы	118	Дополнение 26-3. Практическая биохимия. Метод SELEX для получения РНК с заданными свойствами	154
Возможно селективное ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы	121	Дополнение 26-4. Расширяющийся мир РНК, или транскрипты с неизвестной функцией	156
Краткое содержание	122	Краткое содержание	159
26.2. Процессинг РНК	122	Ключевые термины	159
К 5'-концу эукариотической мРНК присоединяется кэп	123	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	159
Из ДНК в РНК транскрибируются и интроны, и экзоны	125	Вопросы и задачи	161
РНК катализирует сплайсинг интронов	125	Биохимия в Интернете	162
На 3'-конце молекулы мРНК имеются характерные структуры	130	Анализ экспериментальных данных	162
Альтернативный процессинг РНК приводит к образованию нескольких продуктов одного гена	131		

27	Метаболизм белка	165
27.1.	Генетический код	166
	Генетический код был расшифрован с помощью искусственных мРНК	167
	Дополнение 27-1. Исключение, подтверждающее правило: природные вариации генетического кода	172
	«Качание» позволяет некоторым молекулам тРНК распознавать более одного кодона	172
	Считывание последовательности зависит от сдвига рамки и редактирования РНК	175
	Краткое содержание	178
27.2.	Синтез белков	178
	Синтез белка происходит в пять стадий	179
	Рибосома — сложная надмолекулярная машина	180
	Дополнение 27-2. Из мира РНК в мир белка	182
	Транспортные РНК имеют специфическую структуру	184
	Стадия 1: аминоксил-тРНК-синтетазы присоединяют определенные аминокислоты к соответствующим молекулам тРНК	186
	Дополнение 27-3. Естественное и искусственное расширение генетического кода	191
	Стадия 2: синтез белка инициирует определенная аминокислота	195
	Стадия 3: пептидные связи образуются на стадии элонгации	199
	Стадия 4: для прекращения синтеза полипептида нужен специальный сигнал	202
	Дополнение 27-4. Индуцированные вариации генетического кода: нонсенс-супрессия	203
	Стадия 5: вновь синтезированные полипептиды сворачиваются и процессируются	205
	Многие антибиотики и токсины ингибируют синтез белка	207
	Краткое содержание	209
27.3.	Транспорт и расщепление белков	210
	Посттрансляционная модификация многих эукариотических белков начинается в эндоплазматическом ретикулуме	211

	Гликозилирование играет ключевую роль в транспорте белка	212
	Сигнальные последовательности ядерных белков не отщепляются	216
	Бактерии тоже используют сигнальные последовательности для транспорта белков	217
	Белки проникают в клетки путем опосредованного рецепторами эндоцитоза	219
	Расщепление белков во всех клетках осуществляется специализированными системами	220
	Краткое содержание	223
	Ключевые термины	223
	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	224
	Вопросы и задачи	225
	Анализ экспериментальных данных	227

28 **Регуляция экспрессии генов** **229**

28.1.	Принципы регуляции генов	230
	РНК-полимераза связывается с ДНК в области промоторов	231
	Инициация транскрипции регулируется белками, которые связываются с промоторами или недалеко от них	232
	Многие бактериальные гены собраны в кластеры и регулируются в виде оперонов	234
	Отрицательная регуляция лактозного оперона	235
	Регуляторные белки содержат специальные ДНК-связывающие домены	237
	Регуляторные белки содержат также домены, ответственные за взаимодействие белка с белком	241
	Краткое содержание	243
28.2.	Регуляция экспрессии генов у бактерий	243
	Положительная регуляция лактозного оперона	243
	Многие гены ферментов биосинтеза аминокислот регулируются путем аттенуации транскрипции	245

При индукции SOS-ответа происходит разрушение репрессорных белков	249	Экспрессия эукариотических генов может регулироваться внеклеточными и внутриклеточными сигналами	266
Синтез рибосомных белков происходит координированно с синтезом рРНК	250	Регуляция может осуществляться путем фосфорилирования ядерных факторов транскрипции	268
Функция некоторых мРНК регулируется малыми РНК по <i>цис</i> - или <i>транс</i> -механизму	252	Трансляция многих эукариотических мРНК подавляется	268
Некоторые гены регулируются путем генетической рекомбинации	254	Посттранскрипционный сайленсинг гена опосредован РНК	270
Краткое содержание	256	У эукариот реализуется несколько вариантов РНК-опосредованной регуляции экспрессии генов	271
28.3. Регуляция экспрессии генов у эукариот	257	Развитие контролируется каскадами регуляторных белков	271
Транскрипционно активный хроматин по структуре отличается от неактивного хроматина	257	Дополнение 28-1. О плавниках, крыльях и клювах	278
Хроматин ремоделируется путем ацетилирования и перемещения нуклеосом	258	Краткое содержание	281
Многие эукариотические промоторы подвергаются положительной регуляции	260	Ключевые термины	281
ДНК-связывающие активаторы и ко-активаторы способствуют сборке основных факторов транскрипции	260	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	282
Гены метаболизма галактозы в дрожжах подвергаются и положительной, и отрицательной регуляции	263	Вопросы и задачи	283
Активаторы транскрипции имеют модульное строение	265	Биохимия в интернете	284
		Анализ экспериментальных данных	285
		Приложение А. Принятые в биохимии сокращения и аббревиатуры	287
		Приложение Б. Краткие решения задач и ответы на вопросы	291
		Словарь терминов	347
		Источники иллюстраций	375
		Предметно-именной указатель	389

ЧАСТЬ III

Пути передачи информации

Третья, заключительная, часть книги посвящена биохимическим механизмам, обеспечивающим процессы передачи наследственной информации и эволюции живых существ.

Какова молекулярная основа генетического материала? Как генетическая информация с высокой точностью передается из поколения в поколение? Как возникают редкие изменения в генетическом материале, которые служат исходным материалом для эволюции? Как генетическая информация превращается в аминокислотные последовательности белковых молекул?

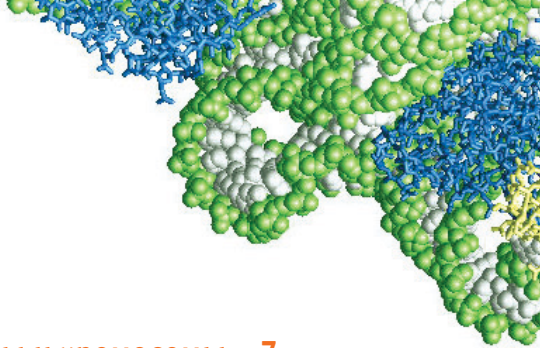
Современное понимание метаболических путей передачи информации сформировалось на стыке генетики, физики и химии — основ современной биохимии. Джеймс Уотсон и Френсис Крик в 1953 г. сформулировали гипотезу двухцепочечной структуры ДНК (см. рис. 8-15 в т. 1). Генетическая теория помогла сформировать концепцию кодирования информации в генах. Выдающиеся открытия в физике позволили установить молекулярную структуру гена. Вклад химии в генетическую теорию состоял в определении состава ДНК. Особая ценность гипотезы Уотсона–Крика заключалась в том, что она смогла обобщить разнообразные наблюдения, полученные в различных областях науки.

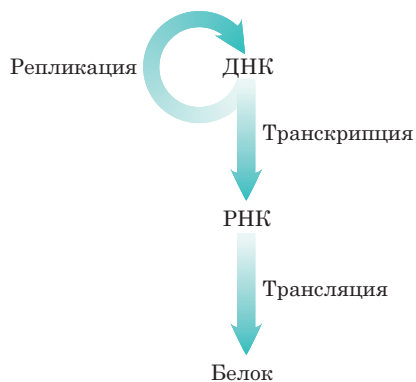
- 24 Гены и хромосомы 7
- 25 Метаболизм ДНК 43
- 26 Метаболизм РНК 105
- 27 Метаболизм белка 165
- 28 Регуляция экспрессии генов 229

Революция в наших представлениях о структуре ДНК неизбежно породила вопросы о функции ДНК. Двухцепочечная структура сама подсказывает механизм копирования ДНК, позволяющий передавать из поколения в поколение закодированную информацию. Открытие матричной и транспортной РНК, а также расшифровка генетического кода позволили понять, как ДНК преобразуется в функциональные белки.

Эти и другие открытия позволили сформулировать основную догму молекулярной биологии, отражающую три главных процесса обработки генетической информации в клетке. Первый процесс — **репликация**, суть которой заключается в копировании ДНК и создании на основе материнской ДНК молекулы дочерней ДНК с идентичной последовательностью. Второй процесс — **транскрипция**, в результате которой часть генетической информации, закодированной в ДНК, превращается в молекулы РНК. Третий процесс — **трансляция**, при которой генетическая информация, закодированная в РНК, переносится на рибосомы, где транслируется в полипептид с определенной последовательностью аминокислот.

Основная догма молекулярной биологии указывает направление передачи информации в





Основная концепция (догма) молекулярной биологии, которая объясняет главные метаболические пути передачи информации — репликацию, транскрипцию и трансляцию. Говорить, что это «догма», не совсем верно. Ведь эта концепция как догма была предложена Френсисом Криком, когда было мало доказательств, подтверждающих выдвинутые идеи, позже ставшие хорошо обоснованной теорией.

клетке: от репликации к транскрипции и трансляции. Термин «догма» не совсем верен и сохранился только по историческим причинам. Он был введен Френсисом Криком в то время, когда существовало мало доказательств, подтверждавших выдвинутые идеи, позже ставшие хорошо обоснованной теорией.

В части III обсуждаются эти и другие процессы, связанные с передачей информации. В главе 24 мы рассмотрим структуру, топологию и упаковку хромосом и генов. Процессы, лежащие в основе догмы, рассматриваются в главах 25–27. В заключение мы рассмотрим процесс регуляции экспрессии генетической информации (глава 28).

Важнейший вопрос, обсуждающийся во всех этих главах, касается сложных процессов биосинтеза информационных макромолекул. Сборка нуклеотидов и аминокислот в определенные последовательности нуклеиновых кислот и белков служит для сохранения и точного копирования матрицы, а ведь на этом основана сама жизнь. Можно подумать, что образование фосфодиэфирных связей в ДНК или пептидных связей в белках — тривиальная задача для клеток, обладающих целым арсеналом ферментативных и химических инструментов, описанных в части II. Однако, чтобы учесть механизмы сохранения и передачи информации, нам придется значительно расширить систему наших взглядов, сформулированную на основе анализа метаболических путей. Химиче-

ские связи должны возникать между *конкретными* субъединицами информационных биополимеров с минимальной вероятностью появления и закрепления ошибок. Это требование оказывает очень серьезное влияние на термодинамику, химию и энзимологию процессов биосинтеза. Образование пептидной связи требует затраты энергии, примерно равной 21 кДж/моль, и может происходить с участием относительно простых ферментов, выступающих в качестве катализаторов. Но для синтеза связи между двумя определенными аминокислотами в конкретной точке полипептида требуется примерно 125 кДж/моль, причем в этом процессе задействовано более 200 ферментов, молекул РНК и специфических белков. Химический процесс образования пептидной связи тот же самый, но здесь подключаются дополнительные процессы, гарантирующие образование этой связи строго между определенными аминокислотами. Информация стоит дорого.

Еще одна важная тема, затрагиваемая в части III, касается динамического взаимодействия между нуклеиновыми кислотами и белками. За исключением тех редких случаев, когда в роли катализаторов выступают молекулы РНК (эта тема обсуждается в гл. 26 и 27), метаболические процессы, связанные с передачей информации, катализируются и регулируются белками. Изучение этих ферментов и других белков имеет не только научное, но и прикладное значение, поскольку позволяет применять их в технологиях, основанных на рекомбинантных ДНК (см. гл. 9 в т. 1).

И вновь возвратимся к теме эволюции. Многие процессы, рассмотренные в части III, возникли миллиарды лет назад, а некоторые прослеживаются вплоть до последнего универсального общего предшественника — LUCA (от англ. *last universal common ancestor*). Рибосомы, практически весь трансляционный аппарат и некоторые элементы транскрипционного аппарата есть у всех живых организмов на нашей планете. Генетическую информацию можно рассматривать в качестве своеобразных молекулярных часов, которые позволяют установить родственные отношения между видами. Общие информационные пути связывают человека со всеми ныне живущими на Земле организмами, а также со всеми прежде существовавшими видами. Изучение этих путей помогает ученым приоткрыть занавес в первом акте пьесы, повествующей о возникновении жизни на Земле.

Суперскручивание значит для ДНК больше, чем просто силовой фактор; оно сохраняет буйную раскидистую ДНК в узких рамках внутриклеточных условий.

— *Николас Коззарелли, Лекции в Харви, 1993*

24

Гены и хромосомы

24.1. Элементы хромосом 7

24.2. Сверхспирализация ДНК 15

24.3. Структура хромосом 27

Размер ДНК предлагает нам интересную биологическую загадку, поскольку молекулы ДНК обычно значительно крупнее самих клеток или вирусных частиц (рис. 24-1). Возникает вопрос, как такие крупные молекулы упакованы в клетке. Чтобы ответить на этот вопрос, следует перейти от рассмотрения вторичной структуры ДНК (см. гл. 8) к ее удивительной третичной структуре, лежащей в основе строения **хромосом** — хранилища генетической информации. В начале главы мы рассмотрим основные элементы хромосом, а затем остановимся на обсуждении их размера и организации. Далее мы обратимся к топологии ДНК и обсудим варианты скручивания и суперскручивания молекул. В заключение мы обсудим взаимодействия ДНК с белками, способствующие компактной укладке хромосом.

24.1. Элементы хромосом

Клеточная ДНК содержит гены и межгенные области; и те и другие могут выполнять жизненно важные функции. Более сложные геномы, например геномы эукариот, нуждаются в более слож-

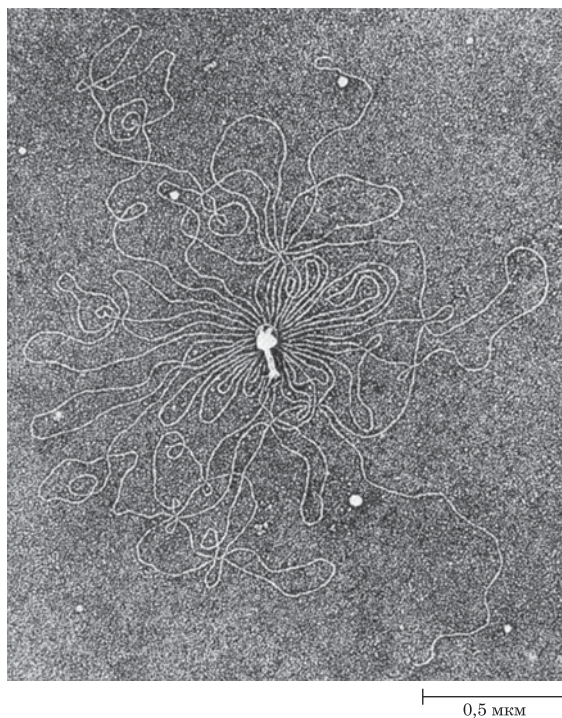


Рис. 24-1. Белковый капсид бактериофага T2 окружает единственную линейную молекулу ДНК этого фага. В результате лизиса частиц бактериофага в дистиллированной воде ДНК вышла из капсида и распространилась по поверхности воды. Частица бактериофага T2 состоит из головки и хвоста, с помощью которого бактериофаг прикрепляется к внешней поверхности бактериальной клетки. Вся ДНК, показанная на этой электронной микрофотографии, обычно содержится внутри головки фага.

ных уровнях организации хромосом. Мы начнем с рассмотрения различных типов последовательностей ДНК и структурных элементов хромосом.

Гены — это участки молекул ДНК, кодирующие полипептиды и молекулы РНК

За последнее столетие наше представление о генах существенно изменилось. Ранее геном называли участок хромосомы, кодирующий или определяющий один признак или **фенотипическое** (видимое) свойство, например цвет глаз. В 1940 г. Джордж Бидл и Эдвард Тейтем предложили молекулярное определение гена. Ученые обрабатывали споры гриба *Neurospora crassa* рентгеновским излучением и другими агентами, вызывающими изменения в последовательности ДНК (**мутации**), и обнаружили мутантные штаммы гриба, утратившие некоторые специфические ферменты, что в некоторых случаях приводило к нарушению целого метаболического пути. Бидл и Тейтем пришли к выводу, что ген — это участок генетического материала, который определяет или кодирует один фермент. Так появилась гипотеза «**один ген — один фермент**». Позднее эта концепция была расширена до определения «**один ген — один полипептид**», поскольку многие гены кодируют белки, не являющиеся ферментами, а полипептид может оказаться субъединицей сложного белкового комплекса.

Современное биохимическое определение гена еще более конкретно. Генами называются все участки ДНК, кодирующие первичную последовательность конечных продуктов, к которым относятся полипептиды или РНК, обладающие

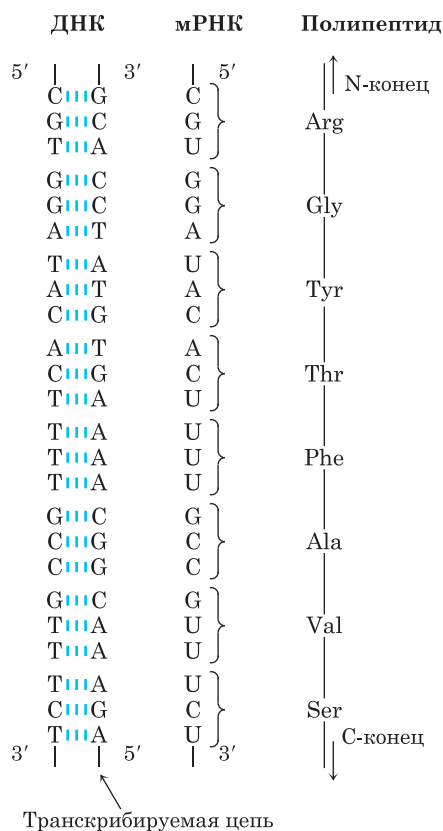


Рис. 24-2. Соответствие между кодирующими участками ДНК, мРНК и аминокислотной последовательностью полипептидной цепи. Триплеты нуклеотидов в ДНК определяют аминокислотную последовательность белка при посредничестве мРНК. Одна из цепей ДНК играет роль матрицы для синтеза мРНК, нуклеотидные триплеты (кодоны) которой комплементарны триплетам ДНК. У некоторых бактерий и многих эукариот кодирующие последовательности прерываются некодирующими участками (так называемыми *интронами*).



Джордж Бидл, 1903–1989



Эдвард Тейтем, 1909–1975

структурной или каталитической функцией. Наряду с генами ДНК содержит и другие последовательности, выполняющие исключительно регуляторную функцию. **Регуляторные последовательности** могут обозначать начало или конец генов, влиять на транскрипцию или указывать место инициации репликации или рекомбинации (гл. 28). Некоторые гены могут экспрессироваться разными путями, при этом один и тот же участок ДНК служит матрицей для образования разных продуктов. Соответствующие механизмы транскрипции и трансляции описаны в гл. 26–28.

Мы можем приблизительно рассчитать минимальный размер гена, кодирующего средний белок. В гл. 27 подробно рассказано о том, что каждая аминокислота в полипептидной цепи кодируется последовательностью из трех нуклеотидов (рис. 24-2); последовательности этих триплетов (кодонов) соответствуют цепочке аминокислот в полипептиде, который кодируется данным геном. Полипептидная цепь из 350 аминокислотных остатков (цепь средней длины) соответствует последовательности из 1050 п. н. Однако многие гены эукариот и некоторые гены прокариот прерываются сегментами ДНК, не несущими информации о белке, и поэтому оказываются значительно длиннее, чем показывает простой расчет.

Сколько генов в одной хромосоме? Хромосома прокариота *Escherichia coli*, чей геном полностью расшифрован, представляет собой кольцевую молекулу ДНК (на самом деле, это не правильный круг, а скорее петля без начала и конца), состоящую из 4 639 675 п. н. В этой последовательности содержится примерно 4300 генов белков и еще 157 генов стабильных молекул РНК. В геноме человека примерно 3,1 млрд пар нуклеотидов, соответствующих почти 29 000 генам, расположенным на 24 разных хромосомах.

Молекулы ДНК гораздо крупнее, чем клеточные или вирусные структуры, в которые они упакованы

Молекулы хромосомной ДНК обычно на много порядков длиннее, чем клетки или вирусные частицы, в которых они содержатся (рис. 24-1; табл. 24-1). Это относится ко всем классам организмов и к вирусам.

Вирусы. Вирусы не могут жить вне другого организма, вне жизнеспособной клетки. Скорее их можно назвать внутриклеточными паразитами, использующими ресурсы клетки хозяина для размножения. Многие вирусные частицы состоят только из генома (обычно одной молекулы РНК или ДНК), окруженного белковым чехлом.

Геномы почти всех вирусов растений и некоторых вирусов бактерий и животных состоят из РНК. Такие геномы обычно небольшого размера. Например, геномы ретровирусов млекопитающих, таких как ВИЧ, содержат около 9000 нуклеотидов, а бактериофаг Q β — 4220 нуклеотидов. Геномы обоих вирусов представляют собой одноцепочечную РНК.

Геномы ДНК-содержащих вирусов намного крупнее (табл. 24-1). Многие молекулы ДНК вирусов какую-то часть жизненного цикла находятся в замкнутой кольцевой форме. При репликации вируса в клетке хозяина могут появляться специфические формы вирусных ДНК, называемые **репликативными формами**; например, многие линейные молекулы ДНК становятся кольцевыми, а одноцепочечные ДНК образуют димеры. Типичным ДНК-содержащим вирусом среднего размера является бактериофаг λ , инфицирующий *E. coli*. Репликативная форма ДНК фага λ внутри клеток представлена кольцевой двухцепочечной спиралью. Двухцепочечная ДНК содержит 48 502 п. н., а длина ее контура составляет 17,5 мкм. Геном бактериофага ϕ X 174 тоже содержит ДНК, но его размер намного меньше; в вирусной частице ДНК представлена одноцепочечной кольцевой молекулой, а двухцепочечная репликативная форма содержит 5386 п. н. Хотя вирусные геномы маленькие, длина их ДНК намного больше, чем размер самих вирусных частиц, содержащих эти молекулы ДНК (табл. 24-1).

Таблица 24-1 Размеры ДНК и вирусных частиц некоторых вирусов бактерий (бактериофагов)			
Вирус	Размер вирусной ДНК, п. н.	Длина вирусной ДНК, нм	Длина вирусной частицы, нм
ϕ X 174	5 386	1939	25
T7	39 936	14377	78
λ	48 502	17460	190
T4	168 889	60800	210

Примечание. Размер ДНК указан для репликативной (двухцепочечной) формы. Длину ДНК оценивали, считая размер пары нуклеотидов равным 3,4 Å (см. рис. 8-13 в т. 1).

Бактерии. В одной клетке *E. coli* содержится примерно в 100 раз больше ДНК, чем в частице бактериофага λ . Бактерия *E. coli* имеет одну двухцепочечную кольцевую молекулу ДНК. Она состоит из 4 639 675 п. н. и достигает в длину примерно 1,7 мм, что превышает длину самой клетки *E. coli*

приблизительно в 850 раз (рис. 24-3). Помимо крупной кольцевой хромосомы в составе нуклеоида многие бактерии содержат одну или несколько маленьких кольцевых молекул ДНК, свободно располагающихся в цитозоле. Такие внехромосомные элементы называют **плазмидами**

Рис. 24-3. Хромосома *E. coli* (длиной 1,7 мм) представлена в линейной форме; рядом приведена клетка *E. coli* (2 мкм).

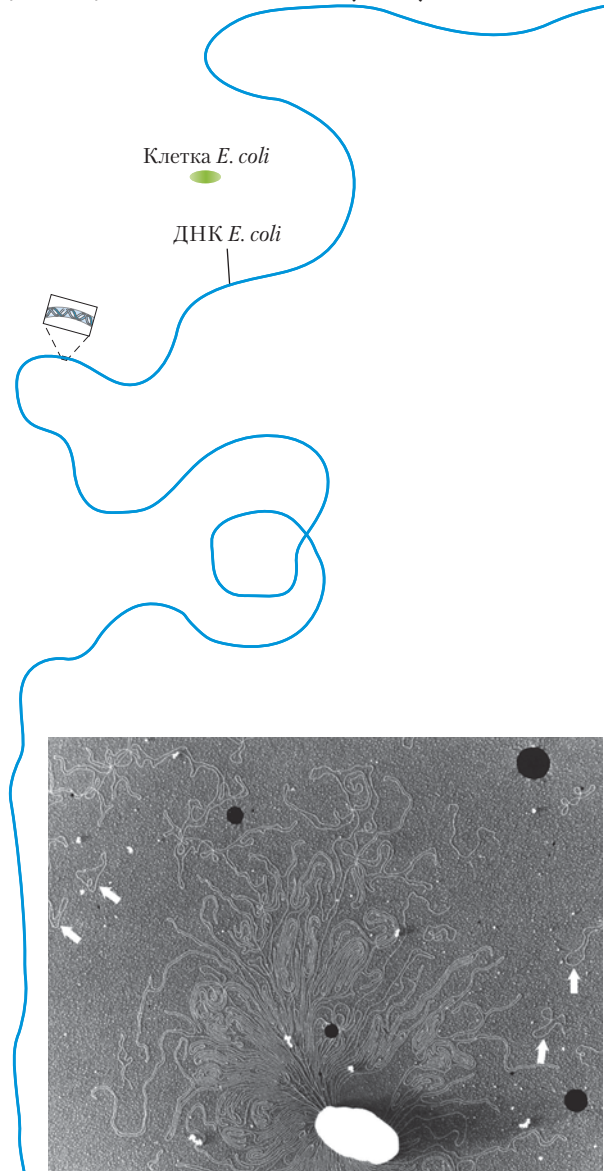


Рис. 24-4. ДНК из лизированной клетки *E. coli*. Белыми стрелками отмечены кольцевые молекулы плазмид. Белые и черные пятна — артефакты.

(рис. 24-4; см. также с. 439 в т. 1). Большинство плазмид состоит всего из нескольких тысяч пар нуклеотидов, некоторые содержат более 10 000 п. н. Они несут генетическую информацию и реплицируются с образованием дочерних плазмид, которые попадают в дочерние клетки в процессе деления родительской клетки. Плазмиды обнаружены не только в бактериях, но также в дрожжах и других грибах.

Во многих случаях плазмиды не дают никаких преимуществ клеткам-хозяевам, и их единственная задача — независимое воспроизведение. Однако некоторые плазмиды несут полезные для хозяина гены. Например, содержащиеся в плазмидах гены могут придавать клеткам бактерий устойчивость к антибактериальным агентам. Плазмиды, несущие ген β -лактамазы, обеспечивают устойчивость к β -лактамным антибиотикам, таким как пенициллин и амоксициллин (см. рис. 6-28 в т. 1). Плазмиды могут переходить от клеток, устойчивых к антибиотикам, к другим клеткам того же или другого вида бактерий, в результате чего эти клетки также становятся резистентными. Интенсивное применение антибиотиков является мощным селективным фактором, способствующим распространению плазмид, кодирующих устойчивость к антибиотикам (а также транспозонов, которые кодируют аналогичные гены) среди болезнетворных бактерий, и приводит к появлению бактериальных штаммов с устойчивостью к нескольким антибиотикам. Врачи начинают понимать опасность широкого использования антибиотиков и назначают их только в случае острой необходимости. По аналогичным причинам ограничивается широкое использование антибиотиков для лечения сельскохозяйственных животных.

Эукариоты. В клетке дрожжей, одних из самых маленьких эукариот, в 2,6 раза больше ДНК, чем в клетке *E. coli* (табл. 24-2). Клетки плодовой мушки *Drosophila*, классического объекта генетических исследований, содержат в 35 раз больше ДНК, а клетки человека — примерно в

700 раз больше ДНК, чем клетки *E. coli*. Многие растения и амфибии содержат еще больше ДНК. Генетический материал клеток эукариот организован в виде хромосом. Диплоидный набор хромосом ($2n$) зависит от вида организма (табл. 24-2). Например, в соматической клетке

Таблица 24-2 ДНК, гены и хромосомы некоторых организмов

	Общая ДНК, п. н.	Число хромосом ^а	Примерное число генов
<i>Escherichia coli</i> (бактерия)	4 639 675	1	4 435
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	12 080 000	16 ^б	5 860
<i>Caenorhabditis elegans</i> (нематода)	90 269 800	12 ^в	23 000
<i>Arabidopsis thaliana</i> (растение)	119 186 200	10	33 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая мушка)	120 367 260	18	20 000
<i>Oryza sativa</i> (рис)	480 000 000	24	57 000
<i>Mus musculus</i> (мышь)	2 634 266 500	40	27 000
<i>Homo sapiens</i> (человек)	3 070 128 600	46	29 000

Примечание. Информация постоянно обновляется; для получения более свежей информации обратитесь к сайтам, посвященным отдельным геномным проектам.

^а Для всех эукариот, кроме дрожжей, приводится диплоидный набор хромосом.

^б Гаплоидный набор. Дикие штаммы дрожжей обычно имеют восемь (октаплоидный) или больше наборов таких хромосом.

^в Для самок с двумя X хромосомами. У самцов есть X хромосома, но нет Y, т. е. всего 11 хромосом.



человека 46 хромосом (рис. 24-5). Каждая хромосома эукариотической клетки, как показано на рис. 24-5, а, содержит одну очень крупную двухспиральную молекулу ДНК. Двадцать четыре хромосомы человека (22 парные хромосомы и две половые хромосомы X и Y) различаются по длине более чем в 25 раз. Каждая хромосома эукариот содержит определенный набор генов.

Если соединить между собой молекулы ДНК человеческого генома (22 хромосомы и хромосомы X и Y или X и X), получится последователь-

Рис. 24-5. Хромосомы эукариот. а — пара связанных и конденсированных сестринских хроматид из хромосомы человека. В такой форме эукариотические хромосомы пребывают после репликации и в метафазе в процессе митоза. б — полный набор хромосом из лейкоцита одного из авторов книги. В каждой нормальной соматической клетке человека содержится 46 хромосом.

ность длиной около одного метра. Большинство клеток человека диплоидны, поэтому общая длина ДНК таких клеток около 2 м. У взрослого человека примерно 10^{14} клеток, таким образом, общая длина всех молекул ДНК составляет $2 \cdot 10^{11}$ км. Для сравнения, окружность Земли — $4 \cdot 10^4$ км, а расстояние от Земли до Солнца — $1,5 \cdot 10^8$ км. Вот как удивительно компактно упакована ДНК в наших клетках!

В клетках эукариот есть и другие органеллы, содержащие ДНК, — это митохондрии и хлоропласты. Молекулы митохондриальной ДНК (мтДНК) намного меньше ядерных хромосом. Размер двухцепочечных кольцевых мтДНК в клетках животных составляет менее 20 000 п. н. (в митохондриях человека молекула мтДНК состоит из 16 569 п. н.). Каждая митохондрия обычно несет от двух до десяти копий молекул мтДНК; их число может возрасти до сотен в некоторых клетках, например в дифференцирующихся клетках эмбриона. У некоторых организмов (например, трипаносом) каждая митохондрия содержит тысячи копий мтДНК; митохондрии организованы в сложный комплекс, называемый кинетопластом. Размеры мтДНК растительных клеток варьируют от 200 000 до 2 500 000 п. н. Молекулы ДНК хлоропластов (хпДНК) тоже двухцепочечные и кольцевые,



Рис. 24-6. Делящаяся митохондрия. Некоторые митохондриальные белки и молекулы РНК (на фотографии не видны) кодируются одной копией митохондриальной ДНК. Митохондриальная ДНК (мтДНК) реплицируется каждый раз, когда делится митохондрия, что предшествует делению клетки.

их длина колеблется от 120 000 до 160 000 п. н. Выдвигалось множество гипотез относительно происхождения ДНК митохондрий и хлоропластов. Общеизвестная сегодня точка зрения заключается в том, что они представляют собой рудименты хромосом древних бактерий, которые проникли в цитоплазму хозяйских клеток и стали предшественниками этих органелл (см. рис. 1-36 в т. 1). Митохондриальная ДНК кодирует митохондриальные тРНК и рРНК, а также несколько митохондриальных белков. Более 95% митохондриальных белков кодируется ядерной ДНК. Митохондрии и хлоропласты делятся вместе с клетками. ДНК этих органелл реплицируется перед делением клетки и в процессе деления, а затем дочерние молекулы мтДНК попадают в органеллы дочерних клеток.

Гены и хромосомы эукариот очень сложно организованы

У бактерий многих видов всего одна хромосома, и почти во всех случаях в каждой хромосоме присутствует по одной копии каждого гена. Лишь немногие гены, например гены рРНК, содержатся в нескольких копиях. Гены и регуляторные последовательности составляют практически весь геном прокариот. Более того, почти каждый ген строго соответствует аминокислотной последовательности (или последовательности РНК), которую он кодирует (рис. 24-2).

Структурная и функциональная организация генов эукариот гораздо сложнее. Исследование хромосом эукариот, а позднее секвенирование полных последовательностей геномов эукариот принесло много сюрпризов. Многие, если не большинство, генов эукариот обладают интересной особенностью: их нуклеотидные последовательности содержат один или несколько участков ДНК, в которых не кодируется аминокислотная последовательность полипептидного продукта. Такие нетранслируемые вставки нарушают прямое соответствие между нуклеотидной последовательностью гена и аминокислотной последовательностью кодируемого полипептида. Эти нетранслируемые сегменты в составе генов называют **интронами**, или **встроенными последовательностями**, а кодирующие сегменты — **экзонами**. У прокариот лишь немногие гены содержат интроны.

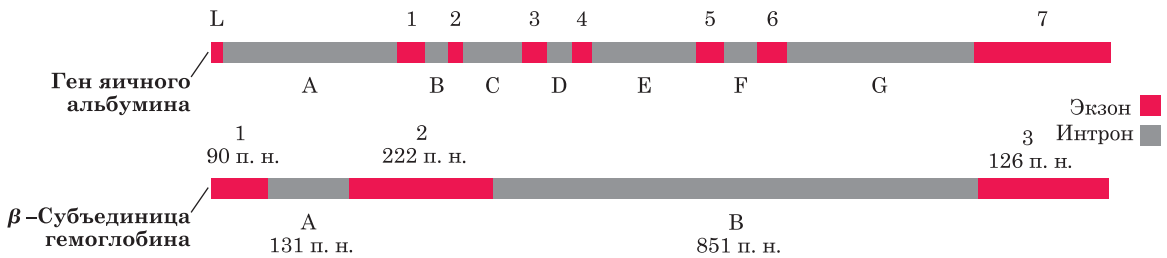


Рис. 24-7. Интроны в двух эукариотических генах. Ген яичного альбумина содержит семь интронов (от A до G), разделяющих кодирующие последовательности восьми экзонов (L, от 1 до 7). Ген β -субъединицы гемоглобина несет два интрона и три экзона, включая один интрон, содержащий более половины пар нуклеотидов данного гена.

В типичных генах высших эукариот последовательности интронов обычно намного длиннее, чем последовательности экзонов. Например, в гене одной полипептидной цепи яичного белка овальбумина (рис. 24-7) интроны намного длиннее экзонов: семь интронов вместе составляют 85% ДНК гена. В гене β -субъединицы гемоглобина более половины ДНК содержится в единственном интроне. Ген мышечного белка титина чемпион по количеству интронов — их 178. В генах гистонов, по-видимому, интронов нет. В большинстве случаев функция интронов не установлена. В целом, лишь около 1,5% ДНК человека являются «кодирующими», т. е. несут информацию о белках или РНК. Однако с учетом крупных интронов получается, что ДНК человека на 30% состоит из генов.

Поскольку гены составляют относительно небольшую долю в геноме человека, значительная часть ДНК остается неучтенной. На рис. 24-8 на круговой диаграмме представлены типы последовательностей в геноме. Большая часть некодирующей ДНК существует в форме повторяющихся последовательностей нескольких типов. Самое удивительное, что примерно половина генома человека состоит из повторяющихся последовательностей подвижных генетических элементов — участков ДНК размером от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований, которые перемещаются с места на место внутри генома. Эти подвижные генетические элементы (транспозоны) — пример молекулярных паразитов, эффективно расселяющихся внутри генома хозяина. Многие транспозоны

несут гены белков, которые катализируют процесс транспозиции, описанный более подробно в гл. 25 и 26. Некоторые транспозоны в геноме человека активны и перемещаются с небольшой частотой, но большинство являются неактивными реликтами, измененными в результате мутаций в процессе эволюции. Хотя чаще всего такие элементы не кодируют функциональные белки или РНК, они сыграли важную роль в эволюции человека, поскольку перемещение транспозонов привело к перераспределению других геномных последовательностей.

Еще примерно 3% генома человека составляют **часто повторяющиеся** последовательности, называемые **простыми последовательностями ДНК** или **повторами простых последовательностей (SSR — от англ. simple sequence repeats)**. Эти короткие последовательности размером обычно менее 10 п. н. иногда повторяются в клетке миллионы раз. Простые последовательности ДНК также называют сателлитной ДНК, поскольку при центрифугировании фрагментов клеточной ДНК в градиенте плотности хлорида цезия из-за необычного состава оснований они часто мигрируют в виде отдельных полос (как спутники, «сателлиты»), сопровождающих остальную ДНК. Простые последовательности ДНК не кодируют белки или РНК. Но в отличие от подвижных генетических элементов сателлитная ДНК может выполнять в клетках человека определенные функции, поскольку многие простые последовательности ДНК локализованы в двух специфических участках эукариотических хромосом — в центромере и теломерах.

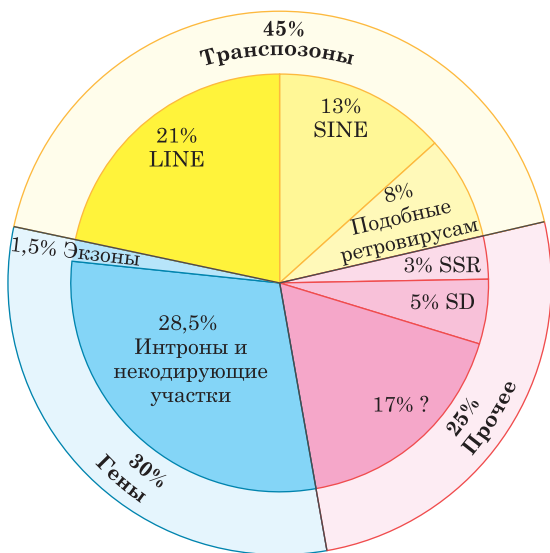
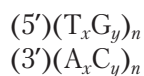


Рис. 24-8. Типы последовательностей в геноме человека. На диаграмме представлены три главные составляющие генома — транспозоны (подвижные генетические элементы), гены и смешанные последовательности. Известно четыре основных класса транспозонов (на диаграмме представлены три из них). Длинные рассеянные повторы (LINE) размером от 6 до 8 т. п. н. (1 т. п. н. = 1000 п. н.) обычно содержат несколько генов белков, катализирующих транспозицию. В геноме насчитывается примерно 850 000 LINE. Длина коротких рассеянных повторов (SINE) примерно от 100 до 300 п. н. В геноме человека их содержится около 1,5 млн, из которых более 1 млн составляют элементы Alu, названные так по той причине, что они обычно содержат один сайт рестрикции для эндонуклеазы рестрикции *AluI* (см. рис. 9-2 в т. 1). В геноме также обнаружено 450 000 копий транспозонов, близких ретровирусам, длиной от 1,5 до 11 т. п. н. Хотя они «захвачены» геномом и не могут перемещаться из клетки в клетку, эволюционно они близки ретровирусам (гл. 26), к которым относится ВИЧ. Еще один класс транспозонов (составляющий <3%, здесь не показан) представлен различающимися по длине фрагментами транспозонов.

Примерно 30% генома составляют последовательности, содержащие гены белков, но только малая часть этой ДНК находится в экзонах (кодирующих последовательностях). К смешанным последовательностям относятся простые короткие повторы (SSR) и повторы крупных сегментов (SD); последние встречаются более чем в одной копии в различных положениях. Как отмечается в гл. 26, почти весь геном в результате транскрипции превращается в последовательность РНК, причем многие участки РНК еще не охарактеризованы. Кроме того, в геноме содержатся остатки транспозонов, которые в процессе эволюции изменились настолько сильно, что их трудно идентифицировать.

Центромера (рис. 24-9) представляет собой последовательность ДНК, к которой в процессе деления клетки прикрепляются белки, связывающие хромосому с митотическим веретеном. Это взаимодействие важно для равномерного и точного разделения наборов хромосом по дочерним клеткам. Были выделены и изучены центромеры *Saccharomyces cerevisiae*. Важнейшие для функционирования центромер последовательности имеют длину около 130 п. н. и содержат большое количество пар А = Т. Центромеры высших эукариот намного длиннее и, в отличие от дрожжевых, обычно содержат простую последовательность ДНК, состоящую из тысяч тандемных копий одной или нескольких коротких последовательностей из 5–10 п. н. в одинаковой ориентации. Роль простых повторов при функционировании центромер пока точно не установлена.

Теломеры (от греч. *telos* — конец) — последовательности на концах хромосом эукариот, стабилизирующие хромосомы. Теломеры заканчиваются многократно повторяющимися последовательностями вида



где x и y обычно имеют значения от 1 до 4 (табл. 24-3). Число теломерных повторов n у большинства одноклеточных эукариот составляет от 20 до 100, а у млекопитающих, как правило, превышает 1500. Концы линейной молекулы ДНК не могут полностью реплицироваться обычным способом клеточным репликационным аппаратом (возможно, это одна из причин кольцевой структуры ДНК у бактерий). Теломерные повторы присоединяются к концам эукариотических хромосом в основном с помощью фермента теломеразы (см. рис. 26-39).

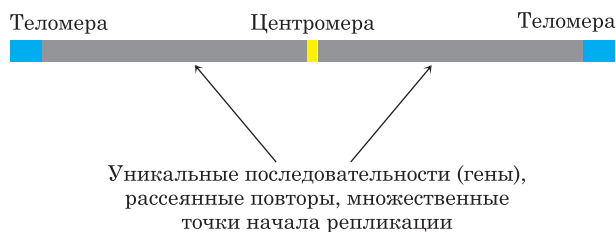


Рис. 24-9. Важные особенности строения хромосомы дрожжей.

Таблица 24-3 Теломерные последовательности

	Последовательность теломерных повторов
<i>Homo sapiens</i> (человек)	$(TTAGGG)_n$
<i>Tetrahymena thermophila</i> (реснитчатое простейшее)	$(TTGGGG)_n$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	$((TG)_{1-3}(TG)_{2-3})_n$
<i>Arabidopsis thaliana</i> (растение)	$(TTTAGGG)_n$

Для изучения функциональной роли структурных элементов эукариотических хромосом были сконструированы искусственные хромосомы (гл. 9 в т. 1). Для функционирования достаточно стабильной линейной искусственной хромосомы нужны лишь три компонента: центромера, теломеры на каждом конце последовательности и участок, в котором происходит инициация репликации. Искусственные хромосомы дрожжей (YAC; см. рис. 9-7) были созданы как инструмент для биотехнологических исследований. Для лечения генетических заболеваний с помощью соматической генной терапии были разработаны искусственные хромосомы человека (HAC; см. доп. 9-2).

Краткое содержание раздела 24.1 ЭЛЕМЕНТЫ ХРОСОМ

- Ген — участок хромосомы, который несет информацию о функциональном полипептиде или молекуле РНК. Наряду с генами хромосомы содержат разнообразные регуляторные последовательности, участвующие в репликации, транскрипции и других процессах.
- Геномная ДНК и геномная РНК вирусов обычно на несколько порядков длиннее содержащих их клеток или вирусных частиц.
- Многие гены эукариот (но лишь некоторые гены бактерий и архей) прерываются некодирующими последовательностями — интронами. Кодировующие участки, разделенные интронами, называют экзонами.
- Менее трети геномной ДНК человека составляют гены. В остальной ДНК много повторя-

ющихся последовательностей различных типов. Паразитирующие нуклеиновые кислоты, известные как транспозоны, составляют примерно половину генома человека.

- Хромосомы эукариот содержат две важные повторяющиеся последовательности ДНК со специфической функцией: центромеры (участки прикрепления митотического веретена) и теломеры, расположенные на концах хромосом.

24.2. Сверхспирализация ДНК

Клеточная ДНК, как мы видели, чрезвычайно компактна и, следовательно, обладает высокой степенью структурной организации. Механизм укладки служит не только для упаковывания

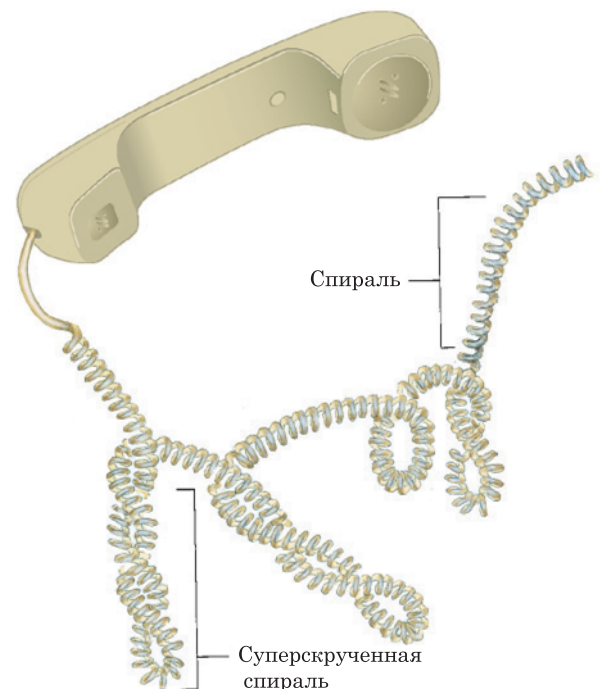


Рис. 24-10. Сверхспирализация. Обычный телефонный шнур закручен в спираль, как ДНК, и сам может образовывать дополнительные петли сверхспирали. Эта аналогия уместна еще и по той причине, что именно телефонный шнур помог Джерому Винограду и его коллегам понять, что многие свойства маленьких кольцевых молекул ДНК могут объясняться суперзакручиванием. Впервые они обнаружили явление сверхспирализации ДНК в 1965 г. в образцах маленьких молекул вирусной ДНК.

ДНК, но и для обеспечения доступа к содержащейся в ней информации. Прежде чем рассмотреть работу этого механизма в таких клеточных процессах, как репликация и транскрипция, мы должны обсудить важную структурную особенность ДНК — **сверхспирализацию**.

Сверхспирализация — скручивание уже существующей спирали. Примером такой структуры является скрученный телефонный шнур. На пути между трубкой и аппаратом часто образуется одна или несколько сверхспиралей (**рис. 24-10**). Молекула ДНК скручена в двойную спираль, в которой обе цепи ДНК закручены вокруг единой оси. Дальнейшее закручивание такой оси вокруг самой себя (**рис. 24-11**) приводит к образованию сверхспирализованной ДНК. Как мы увидим далее, сверхспирализация обычно является результатом структурного напряжения. Если ДНК не закручена вокруг своей оси, ее называют **релаксированной**.

Логично предположить, что при упаковке ДНК возникают различные варианты сверхспирализации. Менее очевидно, что репликация и транскрипция ДНК тоже влияют на сверхспи-

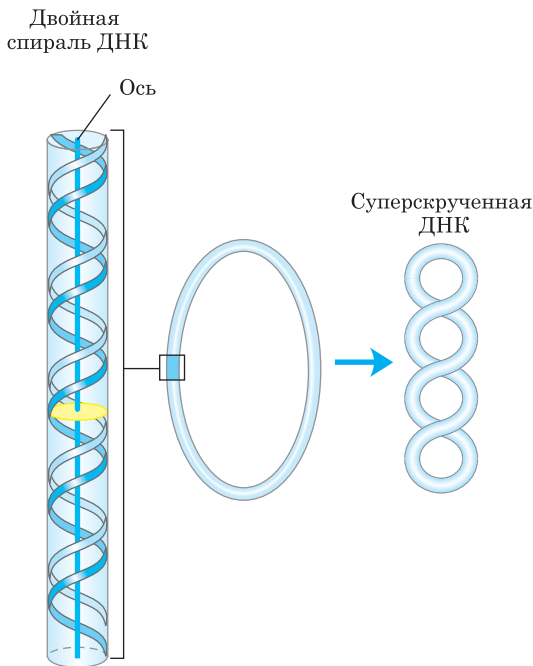


Рис. 24-11. Сверхспирализация ДНК. Когда двойная спираль ДНК закручивается вокруг своей оси, образуется новая спираль (сверхспираль). Суперскрученную ДНК обычно называют сверхспиралью.



Рис. 24-12. При разделении нитей спиральной структуры происходит сверхспирализация. Закрутите две резинки в правозакрученную двойную спираль, как показано на верхнем рисунке. Попросите кого-нибудь подержать один конец и попробуйте разделить нить с другого конца. Вы будете наблюдать суперскручивание.

рализацию и сами зависят от нее. Оба процесса связаны с разделением нитей ДНК, способствующим образованию дополнительных витков спирали (как показано на **рис. 24-12**).

То, что плотно упакованная клеточная ДНК закручивается вокруг самой себя, приобретая сверхспиральную структуру, кажется логичным и даже тривиальным, если бы не одно наблюдение: многие клеточные кольцевые молекулы ДНК остаются в высокой степени суперскрученными даже после того, как их экстрагируют и очищают, освобождая от белков и других клеточных компонентов. Из этого следует, что сверхспирализация — неотъемлемое свойство четвертичной структуры ДНК. Оно характерно для всех молекул клеточной ДНК и строго регулируется каждой клеткой.

Сверхспирали характеризуются несколькими параметрами, которые можно измерить; на основе этих данных были глубже поняты структура и функции ДНК. Исследования во многом базируются на концепциях **топологии** — одного из разделов математики; топология исследует свойства объекта при непрерывной деформации. В случае ДНК непрерывная деформация включает изменения конформации из-за теплового движения и взаимодействия с белками или другими молекулами; прерывистая деформация приводит к разрыву цепей ДНК. Для кольцевых молекул ДНК топологические свойства — это те свойства, которые не меняются при деформации цепей ДНК до тех пор, пока не возникают разрывы.

Топологические свойства изменяются только в результате разрыва и последующего соединения одной или обеих цепей ДНК.

Теперь рассмотрим фундаментальные свойства и физическую основу сверхспирализации.

Большинство клеточных ДНК раскручены

Чтобы понять суть сверхспирализации, сосредоточимся сначала на свойствах небольших кольцевых молекул ДНК, таких как плазмиды и небольшие ДНК-содержащие вирусы. Если такие молекулы ДНК не имеют разрывов ни в одной из цепей, они называются **замкнутыми кольцевыми молекулами ДНК**. Если форма замкнутой кольцевой ДНК близка по структуре В-форме ДНК (структуре Уотсона–Крика; см. рис. 8-13 в т. 1) с одним оборотом двойной спирали на 10,5 п. н., она скорее релаксирована, чем суперскручена (рис. 24-13). Суперскручивание происходит при некотором напряжении структуры. Очищенная замкнутая кольцевая ДНК редко бывает релаксированной, независимо от ее биологического происхождения. Более того, молекулы ДНК, полученные из определенного клеточного источника, имеют характерную именно для них степень сверхспирализации. Следовательно, ДНК напряжена в такой степени, чтобы в ней возникали супервитки, и это состояние регулируется клеткой.

Практически в любой момент времени напряжения двойной спирали ДНК возникают из-за ее **частичного раскручивания**. Иначе говоря, в ДНК оказывается *меньше* витков

спирали, чем в В-форме. Влияние частичного раскручивания обобщено на рис. 24-14. Участок кольцевой ДНК размером 84 п. н. в релаксированной форме может содержать восемь витков двойной спирали, или один виток на 10,5 п. н. Если один из таких витков удален, получается 84 п. н. : 7 = 12,0 п. н. на виток, т. е. больше, чем 10,5 — величина, характерная для В-ДНК (рис. 24-14, б). Это отклонение от наиболее стабильной формы ДНК приводит к термодинамическому напряжению в молекуле, т. е. к неустойчивой форме ДНК. Отчасти напряжение может быть снято при скручивании ДНК вокруг собственной оси с образованием сверхспирали (рис. 24-14, в; некоторая часть напряжения на участке из 84 п. н. может просто распределяться по раскрученной структуре более крупного фрагмента ДНК). В принципе напряжение может быть компенсировано при разделении двух цепей ДНК на расстоянии около 10 п. н. (рис. 24-14, г). В изолированной замкнутой кольцевой ДНК напряжение, вызванное частичным раскручиванием, обычно в большей степени компенсируется сверхспирализацией, чем при разделении цепей, поскольку скручивание оси ДНК, как правило, требует меньше энергии, чем разрыв водородных связей между парами нуклеотидов. Однако следует отметить, что после частичного раскручивания ДНК *in vivo* ее нити легче разделяются, что позволяет считывать содержащуюся в них информацию.

Каждая клетка активно осуществляет раскручивание своей ДНК с помощью ферментативных процессов (описано ниже), и возникающее в результате напряженное состояние служит для

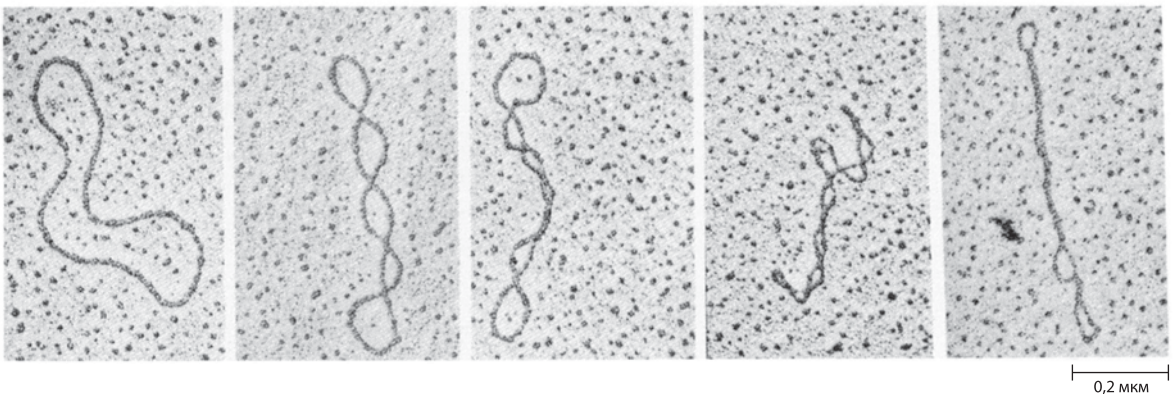


Рис. 24-13. Релаксированная и сверхспирализованная плазмидная ДНК. На крайней левой электронной микрофотографии показана релаксированная молекула; степень сверхспирализации возрастает слева направо.

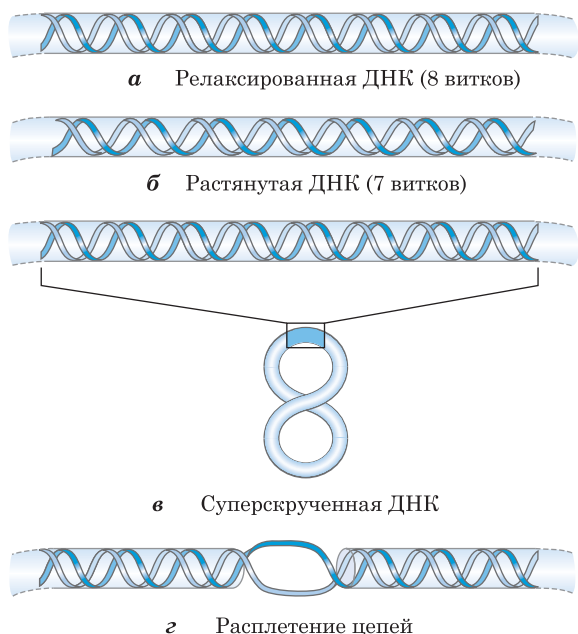


Рис. 24-14. Результаты раскручивания ДНК. *а* — участок ДНК замкнутой кольцевой молекулы длиной 84 п. н. в релаксированной форме с восемью оборотами спирали. *б* — удаление одного витка вызывает напряжение структуры. *в* — обычно напряжение сглаживается при суперскручивании. *г* — частичное раскручивание ДНК несколько облегчает разъединение цепей. Показано, что теоретически раскручивание на один оборот может облегчить разделение цепей на участке длиной около 10 п. н. Однако обычно разделению нитей на таком коротком участке препятствуют водородные связи между парами нуклеотидов, и эффект становится значимым только для более длинных участков ДНК и более сильного раскручивания.

запасания энергии. Клетки поддерживают ДНК в частично раскрученном состоянии для того, чтобы облегчить ее компактную упаковку. Раскручивание ДНК также важно для функционирования ферментов, участвующих в метаболизме ДНК, которые для выполнения своей задачи должны разделять две нити ДНК.

В таком раскрученном состоянии ДНК может существовать лишь в том случае, если она замкнута в кольцо или связана и стабилизирована белками таким образом, что цепи не могут свободно вращаться относительно друг друга. Если одна из цепей в изолированной, свободной от белка кольцевой ДНК разорвана, в этой точке спонтанно возникает свободное вращение и раскрученная ДНК переходит в релаксированное состояние. В мо-

лекуле замкнутой кольцевой ДНК число витков спирали нельзя изменить без хотя бы временного разрыва одной из цепей ДНК. По этой причине число витков спирали в молекуле ДНК является характеристикой сверхспирализации.

Степень скручивания ДНК определяется топологическим параметром — порядком зацепления

Топология предлагает некоторые концепции, которые помогут нам в обсуждении сверхспирализации ДНК, в частности концепцию **порядка зацепления**. Порядок зацепления — топологическое свойство двухцепочечной ДНК, поскольку оно не изменяется при сгибании или деформации ДНК до тех пор, пока целы обе цепи. Число зацеплений обозначают как Lk — от англ. *linking number* (рис. 24-15).

Давайте рассмотрим процесс разделения цепей двухцепочечной кольцевой ДНК. Если две цепи связаны так, как показано на рис. 24-15, *а*, их прочную связь можно назвать топологической связью. Даже если разрушаются все водородные связи и стэкинговые взаимодействия между основаниями, так что нарушается физический контакт между цепями, они по-прежнему

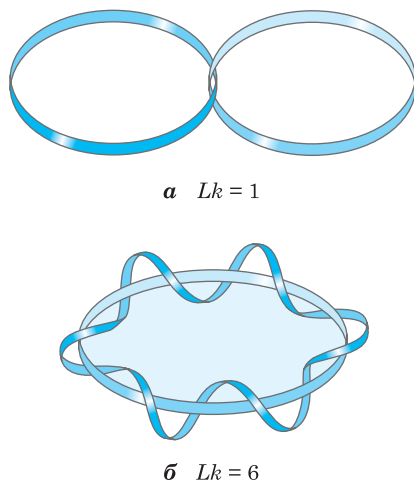


Рис. 24-15. Порядок зацепления (Lk). Здесь, как обычно, каждая голубая лента обозначает одну из цепей двухцепочечной ДНК. Для молекулы на рис. *а* $Lk = 1$, для молекулы на рис. *б* $Lk = 6$. Одна из нитей на рис. *б* изображена незакрученной, чтобы яснее показать границу воображаемой поверхности (бледно-голубого цвета). Число пересечений данной поверхности спиральной нитью соответствует порядку зацепления.

остаются связанными топологическим образом. Представим себе, что одна из кольцевых цепей ограничивает некую поверхность (например, такую, как поверхность мыльной пленки внутри кольца перед тем, как из него выдувают мыльный пузырь). Порядок зацепления можно определить как число пересечений этой поверхности второй цепью. В молекуле на рис. 24-15, *a* $Lk = 1$; в молекуле на рис. 24-15, *б* $Lk = 6$. Для замкнутой кольцевой ДНК порядок зацепления всегда описывается целым числом. Принято, что в правозакрученной спирали порядок зацепления — положительное число (+), а в левозакрученной спирали — отрицательное (-). В ДНК отрицательный порядок зацепления не встречается.

Применим эти рассуждения к молекуле замкнутой кольцевой ДНК, состоящей из 2100 п. н. (рис. 24-16, *a*). Когда молекула релаксирована, порядок зацепления найти просто: это отношению числа всех пар оснований к числу пар оснований, приходящихся на один оборот спирали (примерно 10,5 п.н.); следовательно, в данном случае $Lk = 200$. Чтобы кольцевая молекула ДНК могла быть характеризована определенным порядком зацепления, ни одна из ее цепей не должна содержать разрывов. Если хоть в одной цепи есть разрыв, спирали можно полностью разделить на две цепи. В этом случае топологические связи отсутствуют, и Lk нельзя определить (рис. 24-16, *б*).

Теперь мы можем описать скрученность ДНК, оперируя изменением порядка зацепления. За точку отсчета принимают порядок зацепления в релаксированной ДНК, Lk_0 . Для молекулы на рис. 24-16, *a*, $Lk_0 = 200$; если из молекулы удалить два витка, $Lk = 198$.

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 \quad (24-1)$$

$$\Delta Lk = 198 - 200 = -2$$

Обычно удобно выражать изменение порядка зацепления через параметр, не зависящий от длины молекулы ДНК. Этот параметр называют **плотностью сверхспирализации (σ)**, или **специфическим изменением порядка зацепления**; плотность сверхспирализации равна отношению изменения числа витков спирали к их числу в релаксированной ДНК:

$$\sigma = \Delta Lk / Lk_0 \quad (24-2)$$

В примере на рис. 24-16, *в* $\sigma = -0,01$; это означает, что удален 1% (2 из 200) витков спирали

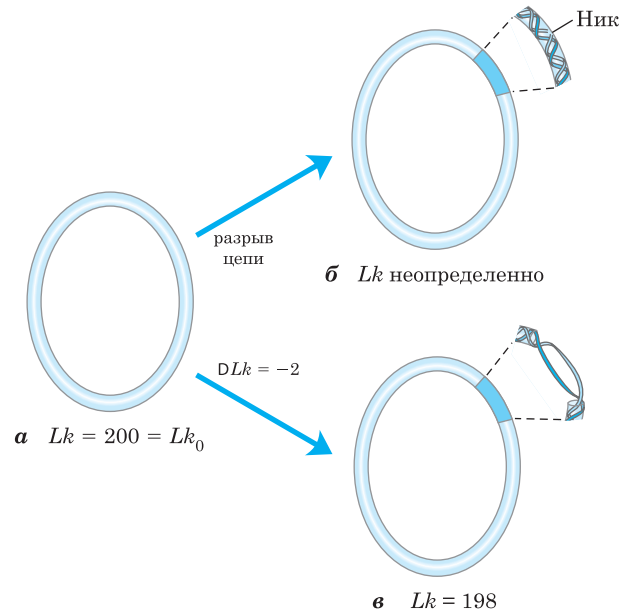


Рис. 24-16. Порядок зацепления на примере молекул замкнутой кольцевой ДНК. Кольцевая ДНК размером 2100 п. н. показана в трех формах: *a* — релаксированная, $Lk = 200$; *б* — релаксированная с одноцепочечным разрывом (ником), Lk нельзя определить; *в* — частично, на два витка, раскрученная ДНК, $Lk = 198$. Частично раскрученная молекула обычно существует в суперскрученном состоянии, но частичное раскручивание также может облегчить разъединения цепей ДНК.

в ДНК (в В-форме). Обычно степень раскручивания клеточной ДНК составляет 5–7%; т. е. σ от $-0,05$ до $-0,07$. Отрицательное значение показывает, что изменение порядка зацепления связано с раскручиванием ДНК. Таким образом, сверхспирализация, вызванная частичным раскручиванием, — это отрицательная сверхспирализация. И, наоборот, при некоторых обстоятельствах ДНК может быть перекручена, что выражается положительным значением сверхспирализации. Отметим, что в случае, когда ДНК частично расплетена (отрицательная сверхспирализация), закрученная вокруг оси часть спирали ДНК является зеркальным отражением перекрученной спирали ДНК (положительная сверхспирализация) (рис. 24-17). Сверхспирализация не случайный процесс; характер сверхспирализации по большей части описывается деформацией кручения, возникающей в ДНК при уменьшении или увеличении порядка зацепления по сравнению с В-формой ДНК.

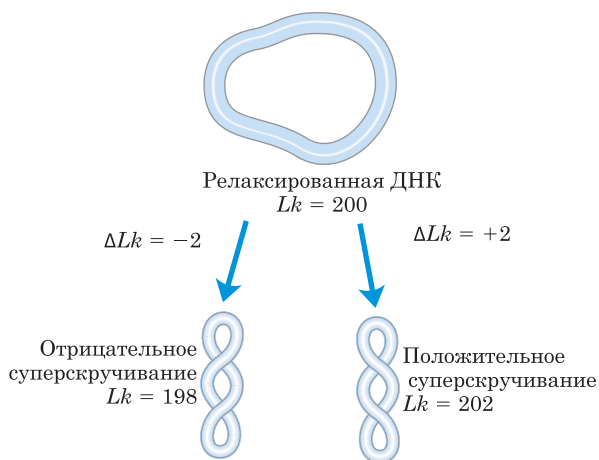


Рис. 24-17. Отрицательная и положительная сверхспирализация. Для релаксированной молекулы ДНК, показанной на рис. 24-16, а, частичное раскручивание или перекручивание на два оборота спирали ($Lk = 198$ или 202) приводит к отрицательной или положительной сверхспирализации, соответственно. Заметьте, что ось спирали ДНК и в том и в другом случаях закручивается в противоположных направлениях.

Порядок зацепления может изменяться на ± 1 при разрыве одной цепи ДНК, поворота одного из концов на 360° вокруг второй цепи и соединения разорванных концов. Такое изменение не влияет на число пар нуклеотидов или число атомов в кольцевой молекуле ДНК. Две формы кольцевой ДНК, отличающиеся только таким топологическим свойством, как порядок зацепления, называются **топоизомерами**.

Пример 24-1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОТНОСТИ СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИИ

Какова плотность сверхспирализации σ замкнутой кольцевой молекулы ДНК длиной 4200 п. н., для которой порядок зацепления $Lk = 374$? Какова плотность сверхспирализации ДНК той же длины при $Lk = 412$? Сверхвитки этих молекул положительны или отрицательны?

Решение. Найдем Lk_0 . Для этого длину кольцевой ДНК (в п. н.) делим на 10,5 п. н./виток: $(4200 \text{ п. н.}) / (10,5 \text{ п. н. / виток}) = 400$. Теперь по формуле 24-1 можно найти ΔLk : $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 374 - 400 = -26$. Подставим значения ΔLk и Lk_0 в формулу 24-2: $\sigma = \Delta Lk / Lk_0 = -26 / 400 = -0,065$.

Поскольку сверхспирализация отрицательная, молекула ДНК несет отрицательные сверхвитки.

Если для той же молекулы ДНК $Lk = 412$, $\Delta Lk = 412 - 400 = 12$, следовательно, $\sigma = 12 / 400 = 0,03$. Сверхспирализация положительная, молекула ДНК несет положительные сверхвитки.

Порядок зацепления имеет две структурные составляющие — **кручение** (коэффициент закрученности; Tw — от англ. *twist*) и **райзинг** (изгиб; Wr — от англ. *writhe*) (рис. 24-18). Их гораздо труднее описать, чем порядок зацепления, но кручение можно рассматривать как меру скручивания (число витков) оси спирали, а райзинг как меру локального изгиба или пространственной связи соседних пар оснований (число сверхвитков). При изменении порядка зацепления часть возникающего напряжения обычно компенсируется при закручивании (сверхспирализации) и изгибе, что выражается уравнением:

$$Lk = Tw + Wr$$

Параметры Tw и Wr не обязательно целочисленные. Кручение и райзинг имеют скорее геометрическую, чем топологическую природу, поскольку изменяются при деформации замкнутой кольцевой молекулы ДНК.

Частичное раскручивание ДНК способствует сверхспирализации и в определенной мере

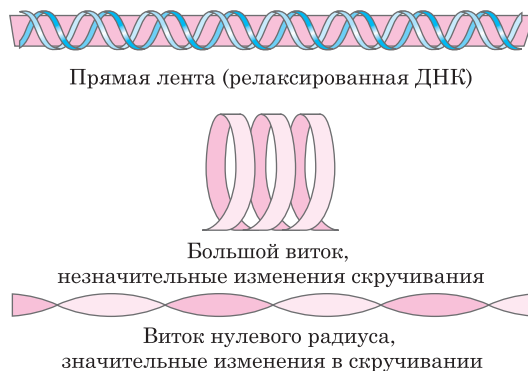


Рис. 24-18. Кручение и райзинг на модели резинового шнура. Розовый резиновый шнур изображает ось релаксированной молекулы ДНК. Напряжение, возникающее при закручивании резинки (как при частичном раскручивании ДНК), проявляется в виде кручения или райзинга. Топологические изменения порядка зацепления обычно сопровождаются изменением как кручения, так и райзинга.

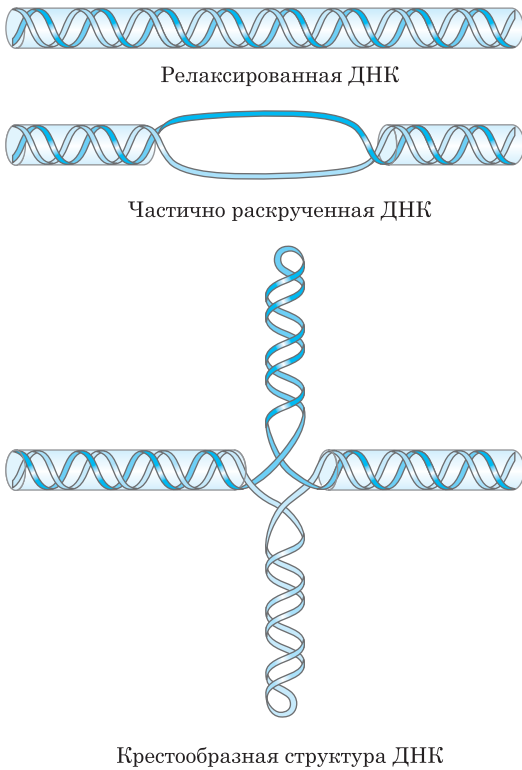


Рис. 24-19. Облегчение образования крестообразных структур при частичном раскручивании ДНК. В принципе, крестообразные структуры могут формироваться на палиндромных последовательностях (см. рис. 8-19 в т. 1), но они редко возникают в релаксированной ДНК, поскольку в линейной ДНК размещается больше пар оснований, чем в крестообразных структурах. Частичное раскручивание ДНК облегчает разделение цепей и формирование крестообразной структуры на соответствующих участках последовательности.

упрощает разъединение цепей, а также облегчает ряд структурных изменений в молекуле. Физиологическое значение этих изменений не столь велико, но они помогают проиллюстрировать последствия частичного раскручивания. Напомним, что крестообразная структура (см. рис. 8-19 в т. 1) обычно содержит несколько неспаренных оснований, и именно недостаточная скрученность ДНК помогает сохранять разделение нитей (рис. 24-19). Частичное раскручивание правозакрученной спирали ДНК также облегчает образование коротких отрезков левозакрученной Z-ДНК в тех местах, где последовательность нуклеотидов позволяет реализовать эту форму (гл. 8).

Топоизомеразы катализируют изменение порядка зацепления в ДНК

Сверхспирализация ДНК — строго регулируемый процесс, который влияет на разные аспекты метаболизма ДНК. В каждой клетке есть ферменты, функция которых заключается исключительно в частичном раскручивании и/или релаксации

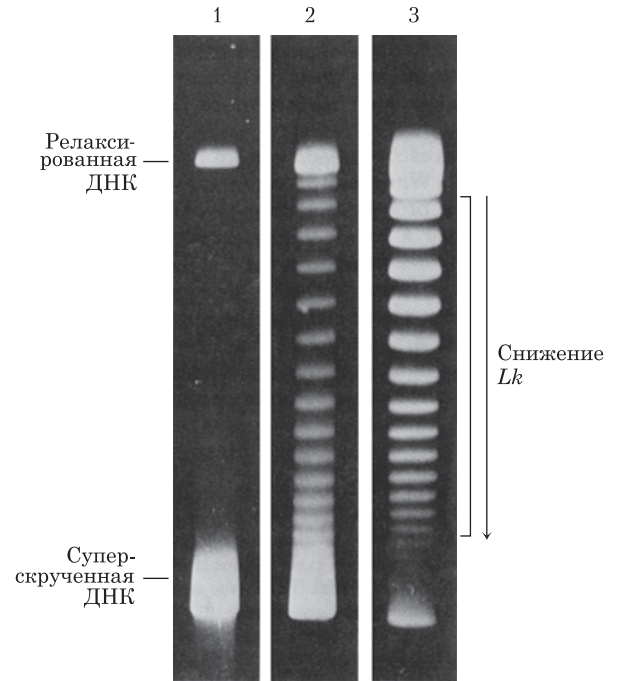


Рис. 24-20. Обнаружение топоизомеров. В этом эксперименте все молекулы ДНК содержат одинаковое число пар оснований, но отличаются по степени сверхспирализации. Поскольку молекулы сверхспирализованной ДНК компактнее, чем релаксированные молекулы, они движутся быстрее при электрофорезе в геле. На представленных гелях разделены топоизомеры с близкими значениями плотности сверхспирализации (молекулы движутся сверху вниз). На дорожке 1 сильно сверхспирализованная ДНК движется в виде единой полосы, хотя, возможно, в ДНК присутствуют разные топоизомеры. На дорожках 2 и 3 видны результаты обработки сверхспирализованной ДНК топоизомеразой типа I; ДНК на дорожке 3 подвергалась воздействию фермента дольше, чем ДНК на дорожке 2. Когда плотность сверхспирализации снижается до значения, начиная с которого гель способен разделять отдельные топоизомеры, становятся видны дискретные полосы. В каждой полосе, выделенной скобкой справа от дорожки 3, содержатся кольцевые молекулы ДНК с одинаковым порядком зацепления; для двух соседних полос порядок зацепления различается на единицу.

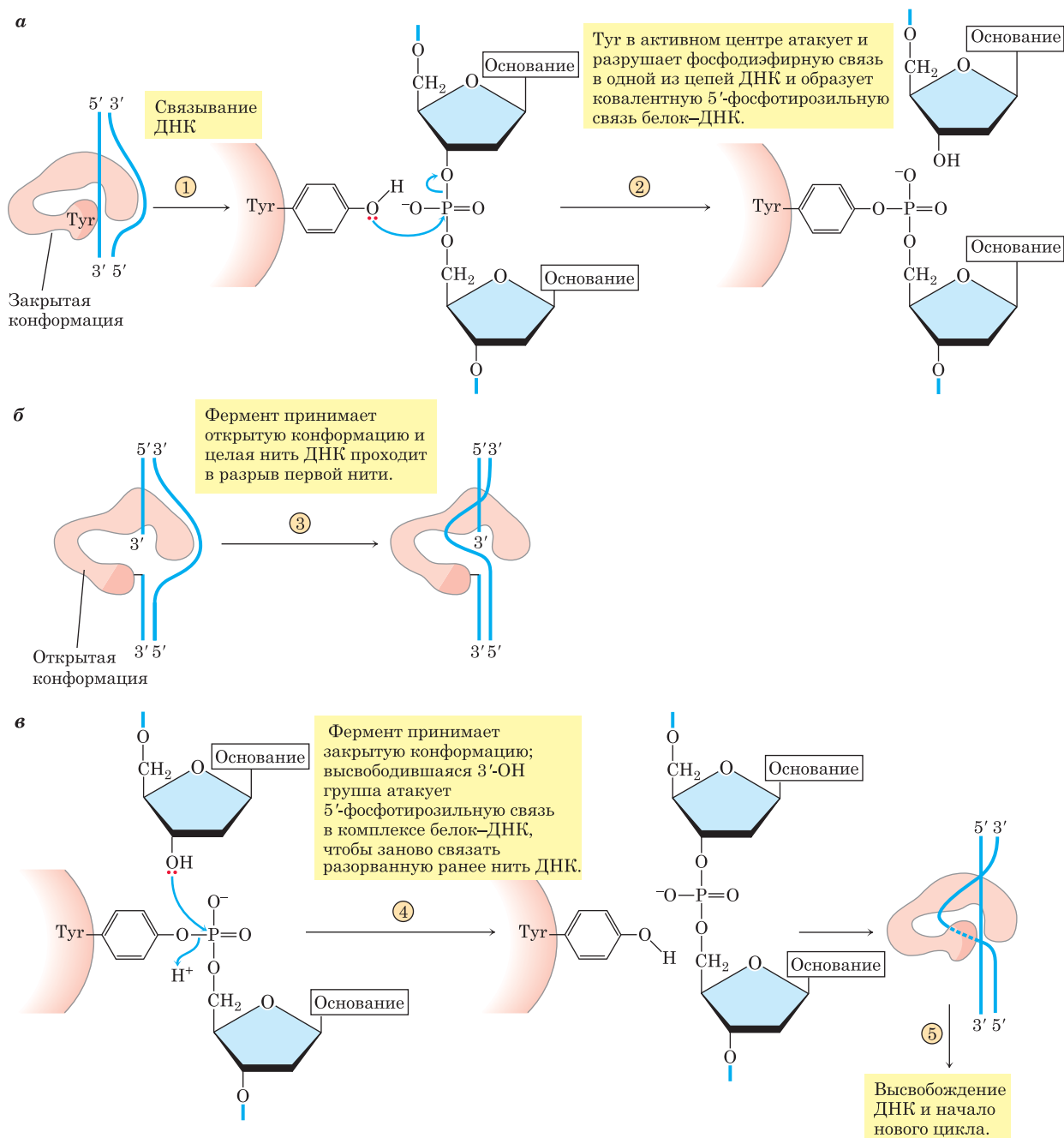


Рис. 24-21. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Бактериальные топоизомеразы типа I изменяют порядок зацепления. Показана последовательность реакций топоизомеразы типа I. Фермент может находиться в закрытой и открытой конформации. *а* — молекула ДНК связывается с ферментом в закрытой конформации, и одна цепь ДНК разрезается. *б* — фермент переходит в открытую конформацию, и вторая цепь ДНК проникает через разрыв в первой цепи. *в* — фермент находится в закрытой конформации, цепь ДНК восстанавливается.

ДНК. Ферменты, повышающие или понижающие степень частичного раскручивания ДНК, называются **топоизомеразами**; они изменяют порядок зацепления в ДНК. Особенно важную роль эти ферменты играют в процессах репликации и упаковки ДНК. Существует два класса топоизомераз. **Топоизомеразы I типа** на короткое время разрывают одну из двух цепей ДНК, затем пропускают целую цепь сквозь разрыв и соединяют разорванные концы; они изменяют Lk с шагом в 1. **Топоизомеразы II типа** разрывают обе нити ДНК и изменяют Lk с шагом в 2.

Действие этих ферментов можно продемонстрировать с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 24-20). Группа идентичных плазмид

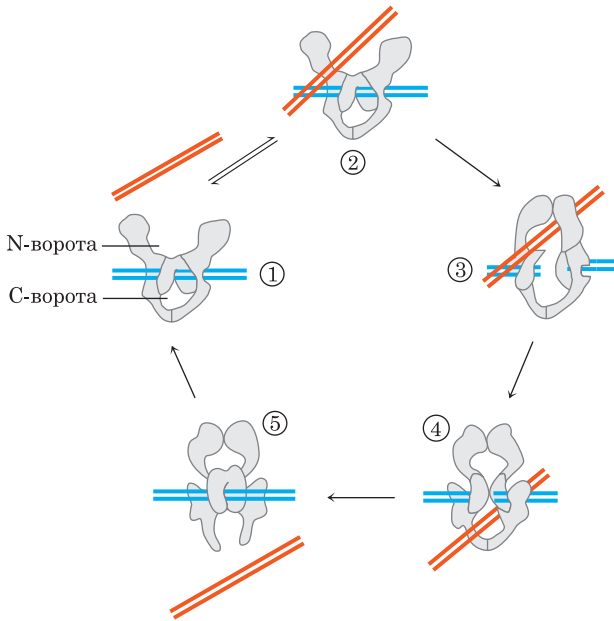


Рис. 24-22. Возможный механизм изменения порядка зацепления под действием эукариотических топоизомераз типа IIА. ① Фермент, состоящий из многих субъединиц, связывает одну молекулу ДНК (синие полосы). Раскрытые полости выше и ниже связанной ДНК называются N- и C-воротами. ② Второй сегмент той же молекулы ДНК (красные полосы) связывается в N-воротах и оказывается запертым. ③ Обе цепи первого сегмента ДНК расщепляются (механизм этой реакции аналогичен механизму, изображенному на рис. 24-20, б), и ④ второй сегмент ДНК проходит сквозь разрыв. ⑤ Разорванная ДНК восстанавливается, и второй сегмент ДНК высвобождается через C-ворота. В ходе данного цикла связываются и гидролизуются две молекулы АТФ; одна молекула АТФ, вероятно, гидролизуется на стадии образования комплекса на этапе ④. Остальные подробности гидролиза АТФ в данной реакции еще предстоит установить.

с одинаковым порядком зацепления движется в геле в виде дискретных полос. Метод позволяет разделить топоизомеры со значениями Lk , различающимися всего на 1, и обнаружить изменения порядка зацепления, вызванные топоизомеразами.

Клетки *E. coli* имеют не менее четырех разных топоизомераз (от I до IV). Топоизомеразы типа I (топоизомеразы I и III) обычно релаксируют ДНК, удаляя отрицательные сверхвитки (повышают Lk). Механизм, с помощью которого бактериальные топоизомеразы типа I изменяют порядок зацепления, показан на рис. 24-21. Бактериальный фермент типа II (топоизомераза типа II, или ДНК-гираза) может вызвать отрицательное суперскручивание (уменьшает Lk). Этот фермент для осуществления реакции использует энергию АТФ. Для изменения порядка зацепления ДНК топоизомеразы типа II разрывают обе цепи молекулы ДНК и пропускают в образовавшуюся брешь другой дуплекс. Степень сверхспирализации бактериальной ДНК поддерживается путем регуляции суммарной активности топоизомераз I и II.

В эукариотических клетках тоже есть топоизомеразы типов I и II. Топоизомеразы I и III — ферменты типа I, а единственный фермент типа II у позвоночных присутствует в двух изоформах — II α и II β . Большинство топоизомераз типа II, включая ДНК-гиразу архей, похожи и принадлежат к одному семейству — к типу IIА. У архей, кроме того, есть необычные топоизомеразы IV, составляющие семейство типа IIВ. Эукариотические топоизомеразы типа II не могут частично раскручивать ДНК (формировать отрицательные сверхвитки), но могут релаксировать как положительное, так и отрицательное суперскручивание (рис. 24-22).

Как мы увидим в следующих главах, топоизомеразы играют ключевую роль в метаболизме ДНК, поэтому они важные мишени лекарств, предназначенных для борьбы с бактериальными инфекциями и новообразованиями (доп. 24-1).

Для компактной упаковки ДНК нужна особая форма сверхспирализации

У молекул сверхспирализованной ДНК есть несколько общих признаков. В молекуле с отрицательной сверхспирализацией сверхвитки закручены вправо (рис. 24-17) и легче образуют

не компактные, а тонкие и длинные петли, часто с множеством ответвлений (рис. 24-23). При характерной для клетки плотности сверхспирализации длина суперскрученных участков с учетом ответвлений составляет примерно 40% длины ДНК. Такой тип сверхспирализации называется **плектонемическим** (от греч. *plektos* — закрученный и *nema* — нить). Этим термином можно обо-

значить любую структуру с нитями, перекрученными неким простым и регулярным образом, и он хорошо объясняет общую структуру сверхспирализованной ДНК в растворе.

Плектонемическая сверхспирализация, а именно в такой форме выделяется ДНК в лабораторных условиях, недостаточно компактна для упаковки ДНК в клетке. В другой сверх-

Дополнение 24-1  **МЕДИЦИНА** Лечение заболеваний путем ингибирования топоизомераз

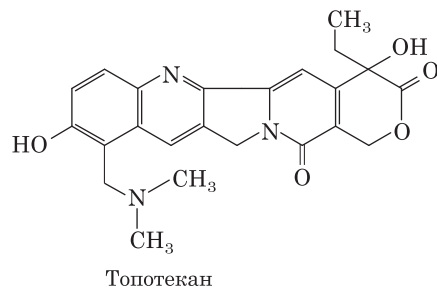
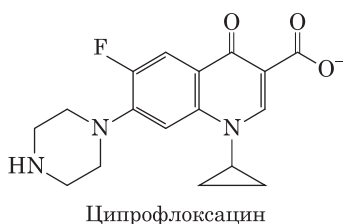
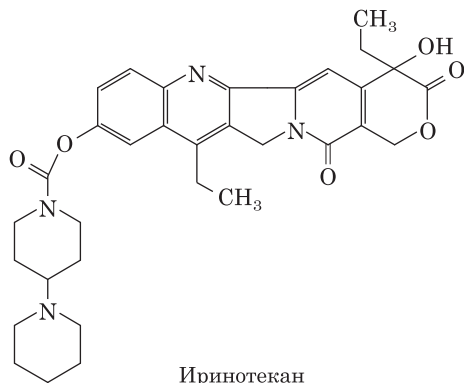
Топология клеточной ДНК непосредственно связана с ее функцией. Без помощи топоизомераз клетки не могут реплицировать и упаковывать свою ДНК и экспрессировать гены и поэтому погибают. Следовательно, ингибиторы топоизомераз могут стать важными фармацевтическими средствами для борьбы с инфицирующими агентами и злокачественными клетками.

В качестве антибиотиков используются два класса ингибиторов бактериальных топоизомераз. Кумарины, среди которых можно назвать новобиоцин и кумермицин А1, представляют собой природные продукты, выделяемые из стрептомицетов. Они ингибируют связывание АТР бактериальными топоизомеразами типа II, ДНК-гиразой и топоизомеразой IV. Эти антибиотики довольно редко используются для лечения инфекционных заболеваний человека, однако поиск эффективных антибиотиков такого рода для клинического применения продолжается.

Антибиотики хинолонового ряда, которые также ингибируют бактериальную ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, впервые вошли в медицинскую практику в 1962 г., когда начала применяться налидиксовая кислота. Это вещество обладает ограниченной эффективностью и в США уже не применяется в клинической практике, однако активное изучение данного класса веществ привело к появлению фторхинолонов, примером которых может служить ципрофлоксацин (ципро). Действие хинолонов основано на ингибировании по-

следней стадии топоизомеразной реакции, заключающейся в устранении разрывов в нитях ДНК. Ципрофлоксацин — антибиотик широкого спектра действия. Это один из немногих препаратов, который эффективен против возбудителей сибирской язвы и рассматривается в качестве мощного средства защиты от биологического оружия. Хинолоны действуют исключительно на бактериальные топоизомеразы, а ингибирование эукариотических ферментов начинается при концентрации на несколько порядков выше терапевтической дозы.

Среди наиболее мощных химиотерапевтических препаратов для лечения онкологических больных есть ингибиторы топоизомераз человека. В опухолевых клетках обычно наблюдается повышенная концентрация топоизомераз, поэтому препараты, ингибирующие



спиральной форме, так называемой **соленоидной** форме (рис. 24-24), может существовать частично раскрученная ДНК. В отличие от вытянутой правозакрученной плектонемической формы сверхспирали для соленоидной формы характерны плотные левозакрученные петли. Эта структура напоминает по форме садовый шланг, аккуратно намотанный на катушку. Хотя

плектонемическая и соленоидная формы сверхспирали принципиально отличаются по структуре, обе эти формы отрицательной сверхспирализации могут возникнуть *на одном и том же* участке частично раскрученной ДНК и могут переходить друг в друга. Плектонемическая форма более стабильна в растворе, соленоидная стабилизируется белками и встречается внутри

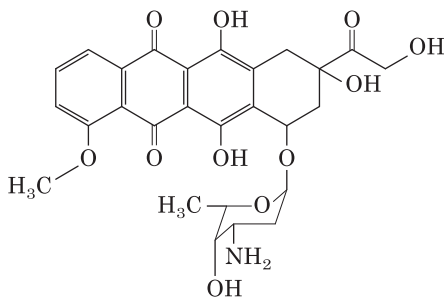
активность этих ферментов, гораздо более токсичны для опухолей, чем для здоровых тканей. В качестве противоопухолевых препаратов используются ингибиторы топоизомераз типа I и II.

Камптотecin, выделенный из декоративного китайского растения и впервые испытанный в клинической практике в 1970-х гг., ингибирует эукариотическую топоизомеразу типа I. Клинические испытания выявили ограниченную эффективность препарата, хотя в доклинических испытаниях на мышах препарат показал хорошие результаты. Однако позднее, в 1990-х гг., были созданы два эффективных производных этого

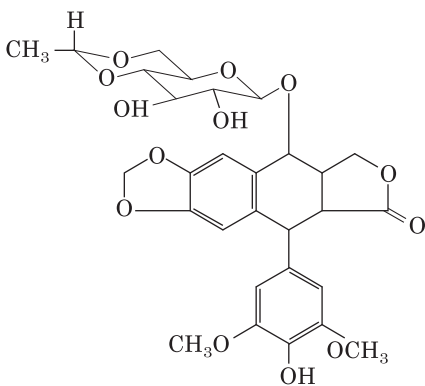
вещества — иринотекан (кампто) и топотекан (гикамтин), применяемые для лечения больных раком прямой и толстой кишки и раком яичников соответственно. Возможно, в ближайшее время будут выпущены другие родственные препараты. Все лекарства этой группы действуют за счет связывания комплекса топоизомеразы с ДНК, в котором ДНК находится в расщепленном состоянии, и ингибируют лигирование.

Целый ряд противоопухолевых препаратов действует на человеческие топоизомеразы типа II; среди них можно назвать доксорубин (адриамицин), эпозид (этопозос) и эллиптицин. Доксорубин, относящийся к классу антрациклинов, эффективен против нескольких видов рака. Большинство препаратов этой группы стабилизируют ковалентные связи в комплексе между топоизомеразой и расщепленной ДНК.

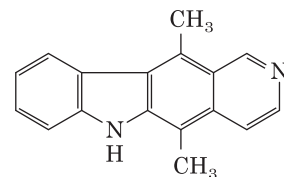
Обычно все перечисленные противоопухолевые препараты повышают количество повреждений ДНК в быстро растущих опухолевых тканях. Однако, к сожалению, могут затрагиваться и здоровые ткани, что приводит к общему токсическому эффекту и нежелательному побочному действию, с которым приходится бороться в ходе курса химиотерапии. По мере повышения эффективности противоопухолевой терапии и улучшения прогноза для онкологических больных на передний план выступает проблема появления новых независимых опухолей. По-видимому, топоизомеразы останутся одним из интенсивно изучаемых объектов в поиске новых лекарственных препаратов для борьбы с раком.



Доксорубин



Этопозид



Эллиптицин

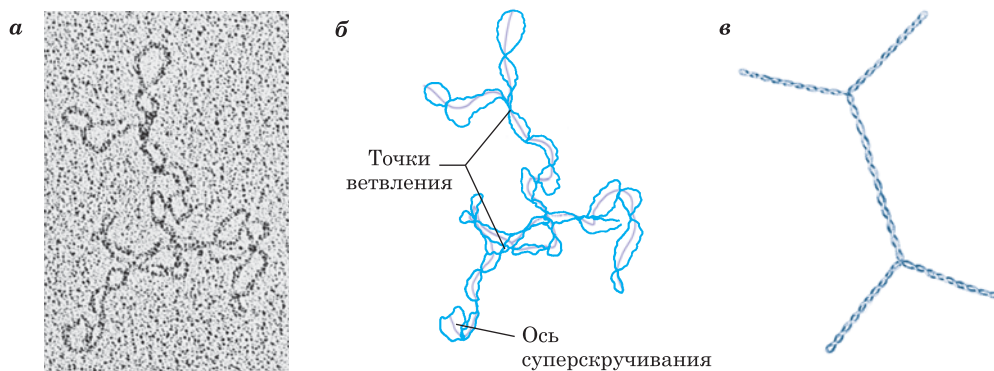


Рис. 24-23. Плектонемическая суперспирализация. *а* — электронная микрофотография плектонемической суперспирализованной плазмидной ДНК; *б* — интерпретация наблюдаемой картины; фиолетовыми линиями обозначены оси сверхвитков; обратите внимание на разветвления спирали. *в* — упрощенный вид данной структуры.

хроматина. ДНК в этой форме гораздо более компактна (рис. 24-24, *б*). Соленоидная суперспирализация — механизм, с помощью которого частичное раскручивание вносит свой вклад в компактную упаковку ДНК.

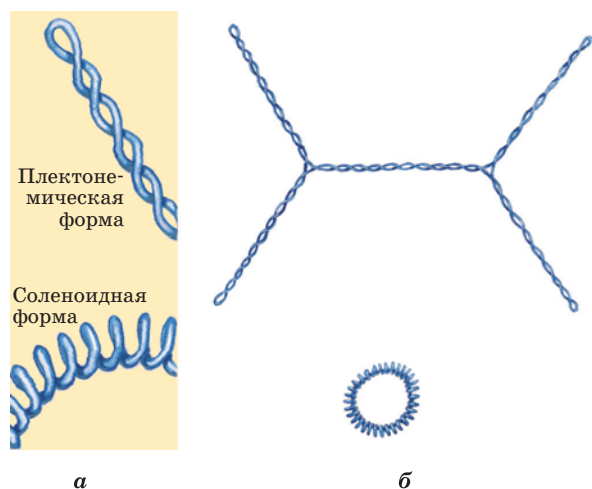


Рис. 24-24. Плектонемическая и соленоидная формы суперспирали. *а* — в плектонемической суперспирали ДНК имеет форму протяженных правозакрученных витков. В соленоидной отрицательной суперспирали эта молекула по форме напоминает трубку из плотных левозакрученных витков. Обе формы могут переходить друг в друга, хотя соленоидная форма обычно не реализуется, пока ДНК не связывается с определенными белками. *б* — плектонемическая (верхняя) и соленоидная формы суперспирали одной и той же молекулы ДНК различаются по размеру. ДНК в соленоидной форме гораздо компактнее.

Краткое содержание раздела 24.2 СВЕРХСПИРАЛИЗАЦИЯ ДНК

- Большая часть ДНК в клетке образует суперспираль. При частичном раскручивании уменьшается общее число витков спирали ДНК по сравнению с релаксированной В-формой. Для поддержания состояния частичного раскручивания ДНК должна быть замкнута в кольцо или связана с белком. Частичное раскручивание количественно оценивается с помощью такого топологического параметра, как порядок зацепления Lk .
- Частичное раскручивание измеряют с помощью плотности суперспирализации σ (специфического изменения зацеплений), которое выражается как $(Lk - Lk_0) / Lk_0$. Для клеточной ДНК величина σ обычно составляет от $-0,05$ до $-0,07$, это означает, что в ДНК не хватает от 5% до 7% витков. Частичное раскручивание ДНК облегчает разделение цепей ферментами метаболизма ДНК.
- Молекулы ДНК, отличающиеся только порядком зацепления, называются топоизомерами. Ферменты, обеспечивающие частичное раскручивание или релаксацию ДНК, называются топоизомеразы; они катализируют изменение порядка зацепления. Топоизомеразы типа I и II за один акт катализа изменяют Lk на одну или две единицы соответственно.

Наука биохимия помогает в понимании происхождения жизни и способствует прогрессу нашей цивилизации.

Третий том популярного учебника биохимии содержит актуальные данные о механизмах передачи генетической информации как у бактерий, так и у эукариот. Обсуждается основная догма молекулярной биологии и ее современное понимание. Рассмотрены процессы, связанные с хранением и реализацией генетической информации: репликация, транскрипция, трансляция, репарация и рекомбинация. Описаны строение хромосом и их упаковка, строение и механизмы работы ферментов, участвующих в метаболизме ДНК и РНК. На современном уровне представлены разные типы РНК и их функции в клетке; достаточное внимание уделено рибозимам. Рассмотрены процессы сплайсинга и процессинга, в том числе альтернативный сплайсинг. Подробно описан биосинтез белка, его транспортировка к месту использования и дальнейшее разрушение. Отдельная глава посвящена регуляции экспрессии генов. Каждая тема содержит дополнения и примеры из медицины, молекулярной биологии, биотехнологии и других смежных областей, а также интересные задания и вопросы. Имеется глоссарий и указатель по материалу всех трех томов.

Для студентов биологических, химических и медицинских вузов, а также научных работников.