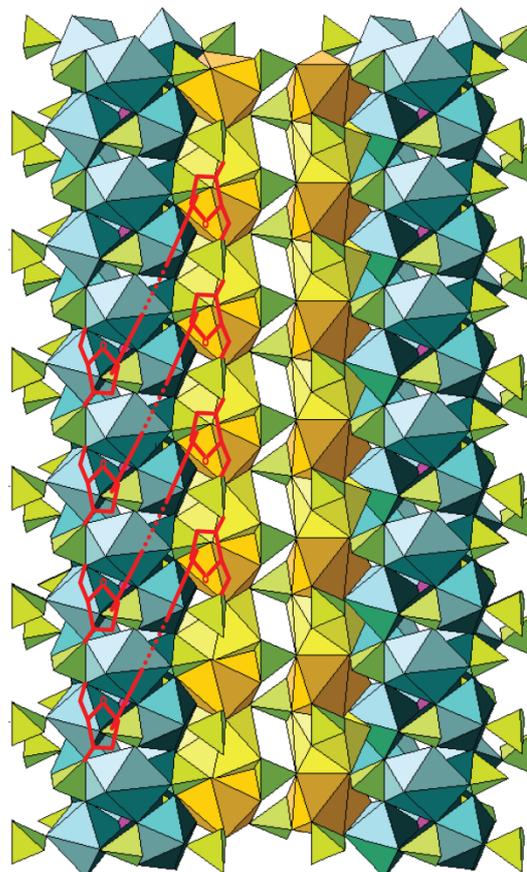
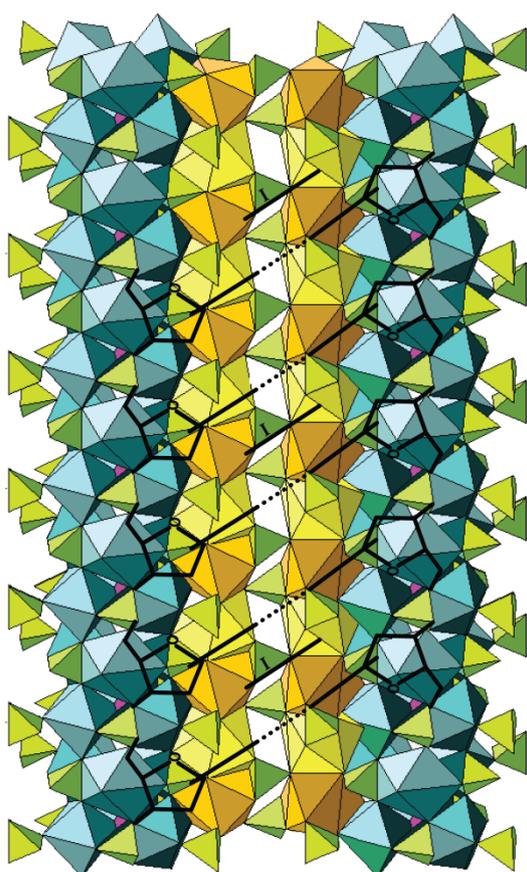


АБИОГЕННАЯ СБОРКА ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ.
/Abiotic Polymerization of Nucleotides./

Алексей Балабин.



Abiotic Polymerization of Nucleotides.

Alexey I. Balabin.

balabinmtv@yahoo.com

Abstract.

The book concerns itself with a novel process of mononucleotide assembly into double-stranded polymers. This process, which I call *stamping*, can be organized either as synthesis of a random double-stranded polynucleotide from mononucleotides or as a reaction of copying a polynucleotide (replication of the DNA or RNA, transcription or reverse transcription). Stamping proceeds in five stages; its crucial step takes place on certain prism faces of apatite crystals. Nucleotides insert their phosphate groups into the positions of PO₄ tetrahedra of the crystal lattice, and thereupon condensation of adjacent nucleotides takes place. Inherent in stamping is the constraint that certain bond lengths in the synthesized polymer be equal to certain interatomic distances P–P in the crystal, so that the width and length of each nucleotide pair are fixed. Geometric regularity of the synthesized polymer imparts a regularity to its bond structure—all nucleotides are joined with 3',5' phosphodiester linkages (and none with 2',5'), and all base pairs are the same Watson-Crick type. Because of the geometric constraints, double-stranded RNA molecules could emerge via stamping from a primordial soup circumventing the combinatorial explosion issue (the multitude of nucleotide-type molecules present in the soup had different geometries hence could not join into the polymer). Furthermore, involvement of the crystal surface imparts stereoselectivity to stamping. Synthesis of a polynucleotide from a racemic mixture of the four possible types of nucleotides (L- and D- enantiomers, α - and β - anomers) will result in formation of four types of macromolecules, each consisting predominantly of similar nucleotides (α -L, α -D, β -L or β -D).

Though stamping is a hypothetical process, its different stages have been carried out in practice separately. Outlining conditions, at which stamping can be implemented as a whole, constitutes the subject of the main part of the monograph. Remarkably, such conditions have been found, and ways to carry out polynucleotide copying (without enzymes) have been outlined, based upon the data available on apatite surface chemistry, apatite crystal chemistry, physical chemistry of nucleic acids along with certain results from enzymology.

In a separate chapter a scenario is proposed for the early history of life, built on the assumption that life originated via stamping and that inheritance relied on stamping apatite crystals, first non-biogenic, supplied by hydrothermal vents, then biogenic ones, until the emergence of *bona fide* polymerases. This hypothesis clarifies the roles played by group I introns in the ancient world, explains how modern polymerases could emerge in the course of miniaturization of the apatite crystals, the ribozymes involved being replaced with enzymes one by one. (The catalytic center of the modern polymerase in its active state, the phosphate group positioned between two metal atoms, is nothing else then a fragment of the apatite structure.) Combining the idea of stamping with the available phylogenetic data, the Archaea come out as descendants of the organisms whose life cycle was based upon RNA replication, whereas the ancestors of Bacteria appear to be the “inventors” of DNA, whose life cycle was based on transcription alternated with reverse transcription. Drawing an analogy between introns and transposons, the latter appear to be likely descendents of single-stranded catalytically active forms of mobile DNA. The origin of translation can be explained next as a spin-off from stamping performed at elevated hydrostatic pressures. A model for the origin of Eukaryotes can also be proposed as further development of these ideas, accounting for their phylogenetic traits, meiosis, spliceosomal introns and inteins, mechanisms of intron mobility (the homing endonuclease, retrohoming), acidocalcinosomes, links between transposons and regulatory sequences of genes, domesticated transposases (including convergent domestication), the nuclear membrane, emergence of the double-stranded DNA, mobilization of double-stranded transposons, gene migration from mitochondria, plastids and nucleomorphs into the nucleus, epigenetic regulation of gene expression, multicellularity. Also explained are nuclear

dimorphism in the ciliates, genome rearrangements in their macronuclei and some other phenomena.

Table of Contents

Preface	
1. Introduction.	6
2. Prebiotic evolution and the RNA world hypothesis.	8
3. Experimental simulation of prebiotic RNA synthesis and replication.	11
3.1. Prebiotic synthesis of nucleotides.	11
3.2. Experimental simulation of polymerization and replication.	15
3.3. Theories highlighting a special role of crystals.	28
3.4. Conclusions.	29
4. Stamping.	30
4.1. The problem and its setting.	30
4.2. Proposed solution.	32
4.3. Preliminary discussion.	42
4.4. First attempts to concretize. Can apatite be the substrate?	49
5. Further concretization. Clues provided by data from molecular biology, cytology, paleobiology and phylogeny.	56
5.1. Stamping at the earliest stages of molecular evolution.	56
5.1.1. Difficulties associated with replication carried out via stamping.	57
5.1.2. Group I introns.	59
5.1.3. Uniformization of nucleotides.	62
5.2. Role of geothermal vents.	63
5.3. Roles of apatite surface chemistry.	65
5.3.1. Apatite sorption activity, its role in autotrophic carbon fixation.	66
5.3.2. Catalytic activity of apatite.	68
5.4. Possible role of apatite in the emergence of DNA.	70
5.4.1. Life cycles of the ancestors of Archaea and bacteria.	72
5.5. Roles of apatite and stamping in the origin of translation.	76
5.5.1. Transit of early biological activity to elevated hydrostatic pressures.	76
5.5.2. Primitive translator as a device for detaching amino acids from ribozymes.	79
5.5.3. Evidence of group I intron participation in translation.	80
5.5.4. Emergence of a genetic code.	84
5.5.5. Evolution of translating devices and their codes.	85
5.5.5.1. Distinctive features of the universal genetic code.	85
5.5.5.2. Interpretation: rise and development of the universal genetic code.	93
5.5.5.3. Triumphant ribosome.	103
5.5.5.4. Miniaturization of the translation devices.	106
5.6. Emergence of the membrane and mobile genetic elements.	107
5.6.1. Hopanoids in bacterial membranes.	108
5.6.2. Group I and group II introns in bacterial genomes.	110
5.7. On the fetter-wearing and gene compression phenomena.	112
5.7.1. Rate of evolution estimates.	114
5.7.2. Conserved sequences in ancient proteins.	115
5.7.2.1. Vacuolar pyrophosphatases (V-H ⁺ -PPiase).	115
5.8. Clues from paleobiology.	117
5.8.1. Archean microfossils from rocks no older than 3.5 billion years.	118
5.8.2. Possible fossils from more ancient rocks.	122
5.9. Cytological evidence of fetter-wearing.	132

5.9.1. Inorganic polyphosphates as predecessors of ATF.	132
5.9.2. Calcification of bacteria.	134
5.9.3. Calcification of mitochondria.	136
5.9.4. Acidocalciosomes.	141
5.9.5. Discussion.	144
5.10. From stamping to polymerases.	145
5.10.1. Development of a <i>bona fide</i> polymerase in the course of stamping refinement.	149
5.10.2. Features of catalytic centers shared by structurally unrelated polymerases. ...	152
5.10.3. Geometric selection.	155
5.11. The origin of Eukaryotes.	158
5.11.1. Facts and traits.	158
5.11.2. Interpretation.	182
5.11.3. Brief discussion.	203
5.12. Some peculiarities in cytology and genetics of ciliates.	204
5.12.1. Nuclear dimorphism and life cycles.	205
5.12.2. Comparison of genomes in micronucleus and macronucleus.	206
5.12.3. Genome fragmentation in macronucleus of <i>Spirotrichea</i>	208
5.12.4. Phosphate vacuoles.	212
5.12.5. Interpretation.	214
5.13. Conclusions.	221
6. Chemisorption of nucleic acids on apatite.	225
6.1. Apatite chromatography.	225
6.2. Apatite hydration layer.	228
6.3. Adsorption of molecules containing acidic functional groups on apatite.	242
6.3.1. Adsorption of pyrophosphate.	244
6.3.2. Adsorption of peroxydiphosphate.	251
6.3.3. Adsorption of bisphosphonates.	252
6.3.4. Adsorption of macrocyclic compounds containing phosphonate groups.	262
6.3.5. Adsorption of citrate and phosphocitrate.	263
6.3.6. Adsorption of polyalcenoic acids.	268
6.3.7. Adsorption of amino acids and acidic proteins.	273
6.3.7.1. Amino acids.	273
6.3.7.2. Statherin and other proline-rich phosphoproteins.	276
6.3.7.3. Amelogenin and osteocalcin.	286
6.3.7.4. Bovine serum albumin.	291
6.3.8. Adsorption of nucleic acids.	294
6.3.9. Discussion. Mechanism of chemisorptions of molecules containing acidic groups on apatite.	303
6.4. Some further features of chemisorption on apatite important to stamping.	309
6.4.1. Two-dimensional long-range order in the hydration layer.	309
6.4.2. Alignment of polynucleotide molecules on the faces of apatite crystals.	310
7. Substrate selection and preparation.	313
7.1. Structure types of double-stranded polynucleotides.	313
7.2. Crystal-chemical criteria for substrate selection.	315
7.3. Preparation of chlorapatite and bromapatite crystals.	319
7.4. Identification of sorbing faces.	321
8. Effects of adsorption on non-covalent interactions in polynucleotides.	326
9. On the use of catalysts.	328
9.1. Active centers of enzymes and ribozymes catalyzing phosphoryl transfer reactions.	329
9.1.1. Active centers without metal atoms.	332
9.1.2. Active centers with two metal atoms.	339
9.1.3. Active centers combining the two catalytic strategies.	341

9.2. Imitation of active centers.	349
9.2.1. Imitation of RNase A and related experiments.	350
9.2.2. Hydrolysis of phosphodiester bond in the presence of metal atoms and their complexes. Imitations of bimetallic hydrolases.	354
9.3. Discussion.	356
10. Identification of factors affording thermodynamic stability to phosphodiester bonds in polynucleotides.	359
10.1. Thermochemistry and energies of bonds involved in polymerization.	360
10.1.1. Thermochemistry of hydrogen bonds and stacking.	360
10.1.2. Thermochemistry of phosphodiester bonds.	363
10.1.3. Preliminary discussion.	373
10.2. Possible temperature effects.	373
10.3. Influence of cations and pH values.	374
10.4. Effects of variation in water activity.	375
10.4.1. Structure-forming role of water molecules in polynucleotides.	376
10.4.2. Involvement of water molecules in non-covalent interactions in polynucleotides.	378
10.5. Thermodynamic stabilization of polynucleotides by hydrostatic pressures.	385
10.5.1. Sustainability of double-stranded DNA and RNA molecular structures at high pressures.	386
10.5.2. Effects of pressure on Watson-Crick pairs.	387
10.5.3. Effects of pressure on non-canonical base pairs.	389
10.5.4. Effects of pressure on stability of intercalates.	391
10.5.5. Stabilizing effect of high pressures on phosphodiester bonds in polynucleotides.	392
10.5.5.1. Signs of phosphodiester bond stabilization in double-stranded DNA at high pressures.	393
10.5.5.2. Thermodynamic stability of single-stranded RNA at high pressures.	394
10.6. Discussion.	402
11. Conclusions. Ways of polynucleotide synthesis via stamping.	404
Works cited.	407

Посвящается памяти

Елены Семёновны Беккер-Кругловой.

Предисловие.

Вопрос о происхождении жизни остаётся одной из важнейших нерешённых проблем естествознания, несмотря на неуклонный рост исследовательской активности в этой области на протяжении почти полувека. До настоящего времени загадкой остаётся и процесс возникновения жизни, и механизм, посредством которого осуществлялась передача наследственной информации на стадии добиологической эволюции. Древнейшие формы жизни, очевидно, не имели в своём распоряжении громоздких молекулярных устройств, именуемых полимеразами, используемых современными организмами для копирования полинуклеотидов. Как бы ни был организован жизненный цикл древнейших организмов, на каких бы реакциях копирования полинуклеотидов он ни основывался, в отсутствие молекулярных машин, подобных современным полимеразам, осуществлялись эти реакции каким-то принципиально иным путём.

Детальное описание особенностей процесса, в котором спонтанно могли образоваться полинуклеотиды, давшие нажало всему живому на Земле, прояснение древнейших механизмов наследования и пути воспроизведения этих процессов в лабораторных условиях составляют предмет настоящей работы. В ней предложен гипотетический процесс, протекающий самопроизвольно на определённых гранях кристаллов апатита, способный привести к спонтанному синтезу двухцепочечной РНК из мононуклеотидов. С некоторыми изменениями этот же процесс может быть организован как репликация РНК или ДНК, транскрипция или обратная транскрипция. Чтобы как-то обозначить описываемый процесс, мы будем называть его *стемпингом*.

Процесс стемпинга осуществляется в пять стадий. Стемпинг не имеет прямых аналогов среди известных процессов полимеризации. Тем не менее, анализ литературы приводит к выводу, что по отдельности все стадии этого гипотетического процесса были уже осуществлены на практике либо непосредственно с нуклеотидами, либо с молекулами, имеющими сходные функциональные группы. Имеющихся экспериментальных данных, как выяснилось, достаточно для выяснения условий, в которых стемпинг должен протекать спонтанно. В то же время, развитие представлений о стемпинге апатита как о механизме копирования полинуклеотидов на стадии добиологической эволюции, в соединении с имеющимися данными по молекулярной биологии, палеобиологии и филогенетическими реконструкциями, позволяет прояснить и ряд вопросов о ранней истории жизни.

Настоящая монография возникла на основе проекта, который первоначально готовился для подачи совместно с Игорем Александровичем Ямсковым в фонд Сколково. Проект имел сугубо практическую направленность. Предполагалось, что предлагаемые способы абиогенного синтеза ДНК и РНК в дальнейшем создадут основу для разработки новых методов регулирования трансляции генов, которые затем можно будет использовать для разработки методов терапии различных заболеваний. Предлагаемые в проекте пути синтеза искусственных ДНК и РНК, в случае успеха, должны быть в равной мере пригодны для синтеза L- и D-энантиомеров, α - и β -аномеров. Однако отсутствующие в природе L-энантиомеры и (или) α -аномеры полинуклеотидов обнаруживают аномальную устойчивость к действию нуклеаз. В отличие от природных РНК и ДНК, время существования которых в живых клетках исчисляется секундами, L-энантиомеры и (или) α -аномеры полинуклеотидов годами не утрачивают активности, будучи помещены в живые клетки или клеточные жидкости. Поэтому, например, способность синтетических α -аномеров нуклеиновых кислот образовывать гомологичные пары, аналогичные уотсон-криковским, с природными β -аномерами может быть использована для разработки методов так называемой *antisense therapy* – перспективного метода терапии различных заболеваний, основанного на регулировании процессов трансляции генов.

Впоследствии Игорь Александрович от участия в проекте отказался, а усилия (его и мои) найти лиц, заинтересованных в воплощении проекта, успеха не имели. В отсутствие

возможностей реализации проекта в России, текст его, следуя совету Всеволода Александровича Твердислова, был переработан в монографию. В процессе переработки, существенно расширена была глава 5, в которой подробно изложена гипотеза о возникновении современных форм жизни, исходя из предположения о возникновении родоначальных молекул двухцепочечной РНК и их последующей репликации при спонтанном стемпинге апатита.

Гипотеза о стемпинге как о механизме наследования оказалась ниточкой, потянув которую можно распутать клубок фактов из эволюционной генетики, молекулярной биологии, цитологии и палеобиологии, ранее не находивших объяснения. Интерпретация этих фактов, а также выявление связей между ними привели к обособлению обширной главы, посвященной палеобиологии, молекулярной биологии и генетике, в монографии, изначально имевшей сугубо физико-химическую направленность.

Значительная часть работы была выполнена в отсутствие доступа к библиотеке, в стране, где возможность пользоваться интернет-ресурсами ограничена, а иногда и вовсе заблокирована. Случаи, когда мне не удалось раздобыть текст публикации, и о содержании её я мог судить только по результатам, представленным в *the abstract*, оговорены в тексте. Помимо статей в реферируемых изданиях, мною использовались и другие источники, производившие впечатление достоверных – вывешенные в интернет курсы лекций, тексты диссертаций. Все используемые источники включены в список литературы, приведённый в конце книги. Проект, положенный в основу рукописи, был составлен по-русски, и в итоге книга была мною написана тем же языком, хотя, в силу укоренившейся привычки думать по-английски это, увы, не способствовало ясности изложения.

Хочу поблагодарить всех тех, кто содействовал выполнению данной работы, на разных её этапах. В начальной стадии работы над проектом мне помогли разъяснения Ярослава Викторовича Кучеренко о некоторых деталях кристаллической структуры апатита. Большую помощь в подборе и предоставлении мне литературы оказали мои бывшие коллеги: кандидат геолого-минералогических наук Илья Владимирович Векслер и доктор геолого-минералогических наук Александр Александрович Борисов. При подготовке рукописи мною были учтены предложения и замечания кандидата геолого-минералогических наук Сергея Станиславовича Мешалкина, доктора химических наук профессора Игоря Александровича Ямского, доктора физико-математических наук профессора Всеволода Александровича Твердислова, ознакомившихся с работой в той её стадии, когда она была проектом. Неоценимую помощь в подготовке главы 5 настоящей рукописи оказали мне многочисленные замечания доктора биологических наук, кандидата физико-математических наук, профессора Михаила Сергеевича Гельфанда, детально ознакомившегося с этой частью работы. Ряд исправлений был предложен Сергеем Мешалкиным, прочитавшим рукопись. Всем им я выражаю мою искреннюю признательность.

Надеюсь, уважаемый читатель найдёт излагаемый в монографии подход к решению проблемы абиогенной полимеризации нуклеотидов интересным, аргументацию – убедительной, а предложенные эксперименты – целесообразными.

Алексей Балабан.

Содержание.

1. Введение.	6
2. Современные представления о добиологической эволюции. Гипотеза мира РНК.	8
3. Эксперименты по абиогенному синтезу и репликации РНК.	11
3.1. Абиогенный синтез нуклеотидов и их составных частей.	11
3.2. Моделирование абиогенной полимеризации и репликации.	15
3.3. Теории, отводящие особую роль кристаллам.	28
3.4. Выводы.	29
4. Стемпинг.	30
4.1. Постановка задачи.	30
4.2. Решение.	32
4.3. Предварительное обсуждение.	42
4.4. Попытки конкретизации.	49
5. Дальнейшая конкретизация. Свидетельства цитологические, палеобиологические, генетические.	56
5.1. Исходные позиции.	56
5.1.1. Трудности, возникающие при осуществлении репликации путём стемпинга.	57
5.1.2. Интроны группы I.	59
5.1.3. Униформизация нуклеотидов.	62
5.2. Роль геотерм.	63
5.3. Роль химических свойств поверхности апатита.	65
5.3.1. Адсорбционная активность. Роль апатита в возникновении дыхания.	66
5.3.2. Роль каталитической активности апатита.	68
5.4. Роль апатита в возникновении ДНК.	70
5.4.1. Жизненные циклы предков бактерий и предков архей.	72
5.5. Роль апатита и стемпинга в возникновении трансляции.	76
5.5.1. Перемещение биологической активности в область высоких давлений. ..	76
5.5.2. Трансляция, как механизм отделения аминокислот от рибозимов.	79
5.5.3. Свидетельства участия интронов группы I в трансляции.	80
5.5.4. Возникновение генетического кода.	84
5.5.5. Эволюция транслирующих устройств и генетического кода.	85
5.5.5.1. Особенности генетического кода.	85
5.5.5.2. Интерпретация. Становление генетического кода.	93
5.5.5.3. «Триумфальное шествие» рибосомы.	103
5.5.5.4. Миниатюризация трансляторов.	106
5.6. Возникновение мембраны и мобильных генетических элементов.	107
5.6.1. Хопаноиды бактериальных мембран.	108
5.6.2. Интроны группы I и группы II в геномах предков бактерий.	110
5.7. О феномене веригиношения и компрессии генов.	112
5.7.1. Оценки скорости эволюции.	114
5.7.2. Консервативные последовательности белков.	115
5.7.2.1. Vacuolar rугophosphatases (V-H ⁺ -PP ₃ ase).	115
5.8. Свидетельства палеобиологические.	117
5.8.1. Микроскопические окаменелости из архейских пород не старше 3.5 млрд. лет.	118
5.8.2. Предполагаемые окаменелости древнее 3.5 млрд. лет.	122
5.9. Цитологические свидетельства веригиношения.	132
5.9.1. Неорганические полифосфаты как предшественники АТФ.	132
5.9.2. Кальцинирование бактерий.	134

5.9.3.	Кальцинирование митохондрий.	136
5.9.4.	Ацидокальциосомы.	141
5.9.5.	Обсуждение.	144
5.10.	Переход от стемпинга к полимеразам.	145
5.10.1.	Механизм возникновения полимераз.	149
5.10.2.	Некоторые закономерности строения полимераз.	152
5.10.3.	Геометрическая селекция.	155
5.11.	Возникновение эукариотов.	158
5.11.1.	Факты, подлежащие объяснению.	158
5.11.2.	Интерпретация.	182
5.11.3.	Краткое обсуждение.	203
5.12.	Некоторые особенности цитологии и генетики инфузорий.	204
5.12.1.	Ядерный диморфизм и жизненные циклы инфузорий. ...	205
5.12.2.	Сопоставление геномов в микронуклеусе и макронуклеусе.	206
5.12.3.	Фрагментация генов у <i>Spirotrichea</i>	208
5.12.4.	Фосфатные вакуоли инфузорий.	212
5.12.5.	Интерпретация.	214
5.13.	Заключение.	221
6.	Хемосорбция нуклеиновых кислот апатитом.	225
6.1.	Апатитовая хроматография.	225
6.2.	Гидратированный слой апатита (<i>Hydration layer</i>).	228
6.3.	Адсорбция апатитом соединений с кислотными группами.	242
6.3.1.	Адсорбция пиродифосфата апатитом.	244
6.3.2.	Адсорбция пероксидифосфата гидроксилapatитом.	251
6.3.3.	Адсорбция бисфосфонатов апатитом.	252
6.3.4.	Адсорбция макроциклических соединений с фосфонатными группами.	262
6.3.5.	Адсорбция цитрата и фосфоцитрата.	263
6.3.6.	Адсорбция полиалкеновых кислот апатитом.	268
6.3.7.	Адсорбция аминокислот и кислотных пептидов апатитом.	273
6.3.7.1.	Аминокислоты.	273
6.3.7.2.	Адсорбция стазерина и других содержащихся в слюне фосфо- протеинов гидроксилapatитом.	276
6.3.7.3.	Взаимодействие амелогенина и остеокальцина с гидроксилapatитом.	286
6.3.7.4.	Адсорбция сывороточного альбумина апатитом.	291
6.3.8.	Взаимодействие нуклеотидов и полинуклеотидов с апатитом.	294
6.3.9.	Обсуждение. Механизм адсорбции апатитом молекул с кислотными группами.	303
6.4.	Некоторые особенности хемосорбции, важные при проведении стемпинга.	309
6.4.1.	Наличие кристаллического дальнего порядка в гидратированном слое.	309
6.4.2.	Укладка одноцепочечного полинуклеотида в основу.	310
7.	Выбор и изготовление основы.	313
7.1.	Структурные типы двухцепочечных полинуклеотидов.	313
7.2.	Кристаллохимические критерии выбора основы.	315
7.3.	Приготовление кристаллов хлор - и бромapatита.	319
7.4.	Идентификация сорбирующих граней.	321
8.	О влиянии адсорбции на нековалентные взаимодействия в полинуклеотидах.	326
9.	Об использовании катализаторов.	328
9.1.	Активные центры ферментов и рибозимов катализирующих реакции переноса фосфата.	329
9.1.1.	Центры, не содержащие ионов металла.	332

9.1.2. Центры с двумя ионами металлов.	339
9.1.3. Центры с двумя ионами металлов и имидазольными группами.	341
9.2. Экспериментальное моделирование активных центров.	349
9.2.1. Моделирование RNase A и связанные с этим эксперименты.	350
9.2.2. Гидролиз фосфодиэфирной связи в присутствии ионов металлов и их комплексов. Моделирование биметаллических гидролаз.	354
9.3. Обсуждение.	356
10. Условия термодинамической стабилизации фосфодиэфирных связей	359
10.1. Термохимия и энергетика связей в полинуклеотидах.	360
10.1.1. Энергетика водородных связей и стэкинга.	360
10.1.2. Энергетика фосфодиэфирных связей.	363
10.1.3. Предварительное обсуждение.	373
10.2. Влияние температуры.	373
10.3. Влияние катионов и pH.	374
10.4. Влияние активности H ₂ O.	375
10.4.1. Структурообразующая роль воды в полинуклеотидах.	376
10.4.2. Участие молекул H ₂ O в нековалентных взаимодействиях в полинуклеотидах.	378
10.5. Термодинамическая стабилизация полинуклеотидов под действием гидростатического давления.	385
10.5.1. Структурная устойчивость ДНК и РНК при высоком давлении.	386
10.5.2. Влияние давления на устойчивость уотсон-криковских пар.	387
10.5.3. Влияние давления на устойчивость неканонических пар нуклеотидов.	389
10.5.4. Влияние давления на устойчивость интеркалятов.	391
10.5.5. Влияние давления на фосфодиэфирные связи.	392
10.5.5.2. Влияние давления на фосфодиэфирные связи в двухцепочечной ДНК. ...	393
10.5.5.3. Стабильность одноцепочечной РНК при повышенных давлениях.	394
10.6. Обсуждение.	402
11. Заключение.	404
Цитируемая литература	407

1. Введение.

Настоящая работа посвящена отысканию условий, в которых возможна абиогенная полимеризация нуклеотидов, то есть образование полинуклеотидов (ДНК или РНК) из мономеров без участия ферментов. Поиск путей абиогенной полимеризации нуклеотидов важен сразу в трёх аспектах. В исследованиях, выполняемых в связи с проблемой происхождения жизни, один из фундаментальных вопросов состоит в отыскании пути соединения мононуклеотидов в полинуклеотиды, посредством которого могла возникнуть исходная молекула РНК, давшая начало всему живому. Ещё один аспект проблемы происхождения жизни состоит в нахождении процесса, посредством которого осуществлялась передача наследственной информации на ранних стадиях молекулярной эволюции. Разумно предположить, что передача наследственной информации осуществлялась посредством репликации РНК, и этот процесс тоже включает в себя соединение мононуклеотидов с образованием полимера. Наконец, с точки зрения приложений в медицине и в практике биохимических исследований определённый интерес представляет возможность получения полимеров из отсутствующих в природе L-энантиомеров и (или) α -аномеров нуклеотидов. В данной работе предложено решение указанных трёх проблем. В ней описан новый процесс абиогенной сборки полинуклеотидов из мононуклеотидов, который мы будем называть *стемпингом*. Стемпинг может быть использован для получения двухцепочечных полинуклеотидов из мононуклеотидов. С небольшими вариациями тот же процесс может быть организован и как реакция копирования полинуклеотидов (репликация ДНК или РНК, транскрипция или обратная транскрипция).

Расположение глав в книге и их содержание воспроизводят последовательность логических шагов, в которых сначала возникает представление о стемпинге, а затем выясняются условия для его практического осуществления. В главе 2 дано краткое изложение современных представлений о возникновении жизни, т.н. гипотезы мира РНК. При этом подчёркивается, что гипотеза мира РНК не объясняет, каким образом на стадии добиологической эволюции осуществлялось копирование полинуклеотидов. Затем, в главе 3, обсуждаются экспериментальные исследования процессов абиогенного синтеза нуклеотидов и полинуклеотидов. Имеющиеся данные не оставляют сомнения в возможности спонтанного образования мононуклеотидов в природе, однако все попытки осуществить полимеризацию нуклеотидов наталкиваются на препятствия принципиального характера. Далее, в главе 4 две проблемы – сборка родоначальной молекулы РНК из нуклеотидов и её репликация – объединены в одну.

В главе 4 высказано предположение, что и полимеризация исходной молекулы РНК, и её репликация осуществлялись по сходному механизму. Затем, в разделе 4.1, с использованием материала глав 2 и 3, сформулированы ограничения, которым должен удовлетворять процесс, позволяющий одно и то же время обойти проблемы, возникающие при полимеризации нуклеотидов, и обеспечить выполнение принципа комплементарности, необходимое для сохранения наследственной информации при передаче её от одного поколения к другому. Сформулированные критерии оказываются столь ограничительными, что возникают сомнения в самой возможности подобного процесса. После этого в разделе 4.2 в качестве решения предлагается гипотетический многостадийный процесс, названный *стемпингом*, протекающий на поверхности некоего ортофосфатного минерала. Обсуждение процесса, выполненное в той же главе 4, приводит к выводу, что стемпинг действительно должен удовлетворять многим из сформулированных критериев. Далее в той же главе 4 на основании кристаллохимических и геохимических сведений высказано предположение, что фигурирующий в стемпинге ортофосфатный минерал есть не что иное как апатит. Доказательству того, что это действительно апатит, что стемпинг удовлетворяет всем сформулированным критериям,

что именно на этом механизме было основано наследование на ранних этапах эволюции, посвящены главы 5-10.

В главе 5 сделана попытка разыскать цитологические, палеобиологические, биохимические и молекулярно-генетические свидетельства того, что копирование полинуклеотидов древнейшими организмами осуществлялось посредством стемпинга апатитовых кристаллов. Такие свидетельства, прямые и косвенные, действительно обнаруживаются, и на этом основании делается вывод о целесообразности попыток воспроизведения стемпинга экспериментальным путём. Анализ имеющихся сведений о физико-химических свойствах поверхности апатита, кристаллохимии апатита, о каталитических механизмах, задействованных в активных центрах биокатализаторов, осуществляющих катализ реакций переноса фосфата, и о термохимии нуклеиновых кислот, выполненный в главах 6-10, приводит к выводу, что различные аспекты и стадии стемпинга по отдельности уже были осуществлены на практике. Поэтому для выяснения путей осуществления стемпинга достаточно свести материал глав 6-10 воедино. Этому посвящена глава 11. В ней предлагаются пути осуществления стемпинга, указан диапазон условий, в котором стемпинг мог осуществляться спонтанно (то есть, указаны условия, в которых могла возникнуть жизнь) и предложены пути осуществления реакций копирования полинуклеотидов, более подходящие для практических приложений.

Ввиду значительности объёма монографии, способного устроить даже мотивированного читателя, важно иметь в виду, что для ознакомления с существенными особенностями стемпинга не обязательно читать всю книгу целиком. Представление о роли стемпинга в возникновении жизни и поддержании её на ранних этапах эволюции можно получить, ограничившись чтением глав 4 и 5. Читатель же, интересующийся лишь вопросами практического осуществления процессов копирования полинуклеотидов, может полностью опустить главу 5.

Объёмистость некоторых глав книги связана с тем, что их написание вылилось в самостоятельные исследования. В полной мере сказанное относится к главе 6, посвящённой особенностям хемосорбции нуклеотидов апатитом. Ввиду недостаточной изученности механизма взаимодействия нуклеиновых кислот с апатитом, проблема решается путём сопоставления данных о взаимодействии всех молекул, имеющих кислотные функциональные группы, с этим минералом. В итоге показано, что хемосорбция нуклеотидов апатитом действительно протекает так, как в описанном нами процессе стемпинга. Читатель, в чьи интересы не входит ознакомление с фактами о хемосорбции различных молекул, имеющих кислотные группы, апатитом, может опустить разделы 6.3.1-6.3.8, составляющие большую часть главы 6. Важно при этом иметь в виду, что материал этих разделов непосредственно используется также в главе 5 при обсуждении роли апатита в возникновении путей фиксации неорганического углерода и в возникновении трансляции.

Сходным образом, материал обширной главы 9, посвящённой возможности ускоренного образования фосфодиэфирных связей при стемпинге путём катализа, может быть опущен при чтении как менее важный. В следующей за ней главе 10 показано, что при достаточно высоком гидростатическом давлении фосфодиэфирные связи должны образовываться достаточно быстро и в отсутствие катализа. Тем не менее, материал главы 9 представляет и определённый интерес для эволюциониста. Для ускоренного образования фосфодиэфирных связей в ней предлагается симитировать каталитические стратегии, задействованные в активных центрах ферментов и рибозимов, катализирующих реакции переноса фосфата. Примечателен сам факт, что эти стратегии легко транслируются в контекст стемпинга. Трудно отделаться от впечатления, что соответствующие каталитические механизмы в контексте стемпинга и возникли.

2. Современные представления о добиологической эволюции. Гипотеза мира РНК.

Примерно 47 лет тому назад три биохимика, D.S. Woese [1], F.H.C. Crick [2] и L.E. Orgel [3], не сговариваясь, опубликовали каждый по работе о происхождении жизни. Публикации эти, оказавшиеся сходными по содержанию, заложили основу современных представлений о т.н. *мире РНК* как о начальном этапе биологической эволюции. Термин *the RNA world*, повсеместно теперь употребляемый в литературе о происхождении жизни, был предложен Вальтером Гильбертом значительно позже, в 1986 году, в его комментариях [4] в связи с открытием каталитической активности различных форм РНК.

Согласно концепции мира РНК, современные организмы являются потомками единственной молекулы РНК, которая была способна к саморепликации и выполняла некоторые из каталитических функций, ныне выполняемых белками, например функции РНК-полимеразы и нуклеазы. В ходе последующей эволюции белки взяли на себя функции катализаторов, поскольку они были способны делать это более эффективно, а молекула ДНК, значительно более стабильная, чем РНК, сделалась хранилищем наследственной информации. В рамках этой гипотезы, молекулы РНК, содержащиеся в современных клетках, интерпретируются как *фоссилии* мира РНК, дошедшие до наших дней.

Представления о мире РНК, достаточно долгое время остававшиеся сугубо умозрительными, не сразу получили широкое распространение. Больше того, согласно некоторым свидетельствам, в 1970-х годах среди западных биохимиков, профессиональный интерес к проблеме происхождения жизни вообще считался чуть ли не возрастным явлением. Область эта полагалась уделом убеждённых сединами *профессоров-иммеритус*, которые могли себе позволить «вещать, рассевшись в кресле».

Следующий этап развития теории мира РНК, приходящийся на 80-е годы, по-разному описывается составителями обзоров. Разные группы исследователей, возможно, шли к принятию сходных взглядов различными путями. Одни, [5], указывают на работы Ноллера [6,7], доказавшего, что РНК важнее для функционирования рибосомы, чем протеины. Другие, [8,9], упоминают работу Н.В.White [10], в которой коферменты рассматриваются как остатки (fossils) вымерших линий метаболизма, вдохновившую палимпсест-модель эволюции [11]. (Хотя сами авторы работы [11] такой связи не признают, см. [12]). Все авторы, однако, согласны в одном: биохимики в массе своей стали всерьёз воспринимать акроним *мир РНК* после непредвиденного открытия т.н. рибозимов (ribozymes), – обладающих каталитической активностью молекул РНК, способных функционировать подобно ферментам [13,14].

Если, после открытия рибозимов, у кого-то ещё оставались сомнения в правомочности гипотезы мира РНК, таковые были отмечены, когда была расшифрована структура рибосомы и обнаружилось, что активный центр, ответственный за образование пептидной связи, лежит глубоко внутри её «ядра», состоящего целиком из РНК, в то время как протеины облепляют это ядро, протискиваясь в него тонкими апофизами, [18,19,20]. Ни одна аминокислотная цепочка не подходит к активному центру рибосомы ближе, чем на 18Å, [21]. Тем самым выяснилось, что рибосома по существу представляет собой рибозим [22], в полном соответствии с оказавшимся провидением предположением Крика “*the primitive ribosome could have been made entirely of RNA*”, высказанном им в вышеупомянутой статье [2].

В настоящее время основные положения гипотезы мира РНК считаются твёрдо установленными, а сама концепция приобрела характерные черты парадигмы. (Парадигмами называют общепринятые на текущий момент, замкнутые на себя, самодовлеющие системы научных взглядов.) Существование мира РНК постулируется в

подавляющем большинстве современных (весьма многочисленных) работ, посвященных проблеме происхождения жизни. Серьезные сомнения в справедливости гипотезы мира РНК остаются лишь у (не менее многочисленных) блогеров из «божественных» интернет-сайтов.

Рибозимы, обнаруженные в живых клетках, катализируют достаточно ограниченный (хотя и важный) набор реакций: во-первых, это рассечение и лигирование природной РНК; во-вторых, это образование пептидной связи при синтезе протеинов в рибосоме. В 1990 году три группы исследователей разработали комбинаторный метод поиска синтетических рибозимов называемый “селекцией *in vitro*” [23, 24, 25]. Этим методом были изолированы рибозимы, способные катализировать более широкий спектр реакций, включающий acyl transfer, N- и S-alkylation, carbon-carbon bond formation, amide bond formation и Michael addition, [15]. Всё это лишний раз подтверждает, что РНК могла выполнять многообразные каталитические функции в древнейших организмах до появления ферментов.

Селекцией *in vitro* были получены и рибозимы, имеющие многие важные черты РНК полимеразы. В частности Bartel с соавторами [26] получили, а лучше сказать – вывели, молекулу РНК (Рис. 2-1) со следующими свойствами: если молекуле предоставить одноцепочечную РНК-матрицу (RNA-template) содержащую до 14 нуклеотидов, РНК-затравку (RNA-primer) и все четыре нуклеозид-трифосфата, то молекула синтезирует цепочку РНК, комплементарную матрице.

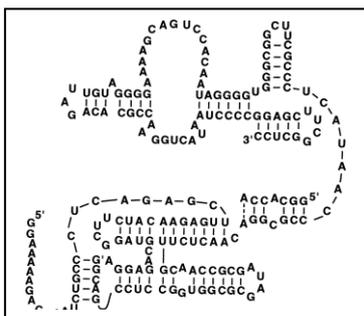


Рис.2-1 А ribozyme that functions as an RNA-dependent RNA polymerase. Из обзора [9].

Появление синтетических РНК-полимераз было встречено с большим энтузиазмом. Leslie Orgel [9], например, писал следующее: “*At present, templates that contain more than 14 residues cannot be copied effectively, but it seems likely that further in vitro evolution will lead to the isolation of a ribozyme capable of copying much longer RNAs. The isolation of such a ribozyme would constitute a major advance in attempts to understand the origin of life.*” Однако до настоящего времени рибозим, способный реплицировать РНК произвольной длины так и не был получен, хотя со времени первой публикации прошло около четверти века. Кроме того, степень соответствия принципу комплементарности, обеспечиваемая рибозимом, на порядки ниже того, что требуется для эффективного сохранения наследственной информации.

Сравнительно недавно был обнаружен ещё один механизм, посредством которого молекулы РНК способны регулировать жизнедеятельность клеток. Как оказалось, небольшие молекулы РНК могут, без какого-либо вмешательства ферментов, регулировать экспрессию генов по принципу обратной связи. Такие молекулы, получившие название РНК-переключателей (*riboswitches*), являются чувствительными к концентрации небольших клеточных метаболитов. Молекула РНК-переключателя связывается с соответствующим метаболитом и в результате меняет собственную конформацию, а это запускает механизм промотирования или наоборот ингибиции экспрессии кодируемых протеинов.

Наличие в современных клетках РНК-переключателей, которых теперь известно около 20 типов [16, 27], тоже было истолковано как наследие мира РНК. Высказывались

предположения, что РНК-переключатели представляют собой древнейший механизм регуляции экспрессии генов [17, 28].

Интересно отметить, что РНК – это не единственный полинуклеотид, обладающий каталитической активностью. В 1994 г. Breaker и Joyce [29] вывели методом селекции *in vitro* первый дезоксирибозим – молекулу ДНК способную функционировать как фермент. В последовавших интенсивных исследованиях, в ходе которых было получено большое количество новых дезоксирибозимов, выяснилось, что дезоксирибозимы ни в чём не уступают рибозимам как катализаторы и при этом обнаруживают существенно более высокую селективность [30, 31].

Напомним, в гипотезе мира РНК молекула ДНК рассматривается как продукт эволюции РНК, в силу своей механической прочности более подходящий на роль хранилища наследственной информации. Создатели теории постулировали, что жизнь на Земле началась с молекулы РНК, будучи уверенны в неспособности ДНК к проявлению достаточной каталитической активности. В свете новых данных нельзя исключить, что молекула-прародительница состояла из ДНК или представляла собой какой-то более сложный гетерополимер, содержащий рибонуклеотиды наряду с дезоксирибонуклеотидами. Тем не менее, открытие дезоксирибозимов не привело к пересмотру постулатов гипотезы мира РНК, вероятно потому, что осуществимость абиогенного синтеза рибонуклеотидов ныне можно считать установленной (см далее, глава 3), а спонтанное образование дезоксирибонуклеотидов (абиогенным путём) представляется в высшей степени маловероятным.

При всех успехах теория мира РНК, развитие её пока не привело к решению проблемы происхождения жизни. Связано это, скорее всего, с присущим теории логическим изъяном принципиального характера, сродни известной *дилемме курицы и яйца* (широко обсуждавшейся в античности): чтобы запустить процесс добиологической эволюции, исходная молекула с самого начала должна обладать способностью к саморепликации. Однако, в рамках существующих теорий, свойство это может быть приобретено только в процессе эволюции.

Парадокс разрешается, если предположить существование некоторого механизма, обеспечившего спонтанную полимеризацию нуклеотидов на стадии добиологической эволюции. Если предположить, что и образование родоначальной молекулы РНК из мононуклеотидов, и последующие циклы репликации осуществлялись в этом процессе, то теория мира РНК обретает искомую логическую безупречность. В основу настоящей работы положена догадка о природе этого явления. Прежде чем её излагать, нам необходимо сформулировать критерии, которым процесс спонтанной полимеризации нуклеотидов должен удовлетворять, а для этого нам понадобятся некоторые сведения о путях абиогенного синтеза нуклеотидов и полинуклеотидов, излагаемые в следующей главе.

3. Эксперименты по абиогенному синтезу и репликации РНК.

Экспериментальные исследования процессов, приведших к возникновению жизни, с известной долей условности можно подразделить на три группы: синтез рибонуклеотидов и их составных частей, поликонденсация нуклеотидов с образованием олигомеров и репликация РНК-олигомеров. Было также опубликовано некоторое число работ, моделирующих абиогенный синтез аминокислот и полипептидов, которые здесь рассматриваться не будут.

Мне кажется, английское *prebiotic synthesis* на русский лучше перевести как *абиогенный синтез*. Этим словосочетанием принято обозначать синтез органических соединений в условиях, которые в принципе могли иметь место на земле в раннем архее. В отсутствие сколько-нибудь надёжных геохимических сведений об начальных стадиях земной эволюции, понятие это оказывается растяжимым. По свидетельству Leslie Orgel [9], споры в духе “*My conditions are more prebiotic than yours*” возникают в профессиональной среде довольно часто. Большинство специалистов, например, синтез (чего бы то ни было) с использованием нуклеозидтрифосфатов абиогенным не признают (см. например [32]), но отдельные авторы придерживаются противоположной точки зрения.

3.1. Абиогенный синтез нуклеотидов и их составных частей.

На протяжении первых 40 лет исследований абиогенного синтеза нуклеотидов считалось, что следует сначала отдельно синтезировать рибозу, отдельно азотистые основания, затем синтезировать нуклеозиды, соединив рибозу с основаниями, а уже после того получить нуклеотиды фосфорилированием нуклеозидов. Исследователи старались не смешивать «углеродно-кислородную химию» (т.е. синтез рибозы) с химией «углеродно-азотной» (синтез оснований), видя в этом угрозу т.н. *комбинаторного взрыва* – образования миллионов нежелательных посторонних молекул, среди которых нуклеозиды составят лишь ничтожный процент. Недавние работы, выполненные в лаборатории Джона Сазерленда, Манчестерский Университет, продемонстрировали ошибочность подобной стратегии. Тем не менее, обсуждаемые подходы и их результаты удобно расположить в такой последовательности: синтез сахаров, синтез азотистых оснований, синтез нуклеозидов и, наконец, синтез нуклеотидов.

Синтез рибозы. Имеется большое число работ, в которых рибозы синтезируются самоконденсацией формальдегида (реакция Бутлерова) в щелочных или слабощелочных водных растворах в присутствии катализаторов. В качестве гетерогенных катализаторов используются суспензии гидроокисей кальция и магния, некоторые глинистые минералы. Есть также примеры успешного гомогенного катализа в присутствии ионов Pb^{2+} , Tl^{+} . Продукты реакции обычно представляют собой сложную смесь пентоз и гексоз. Выход рибозы всегда оказывается ниже 1%. Продукты синтеза обычно нестабильны в условиях опытов и гидролизуются со скоростью близкой к скорости их образования. Более подробное обсуждение можно найти в обзоре [9].

Недавно было показано, что циклические формы пентоз и гексоз образуют стабильные комплексы с силикатом натрия. Поэтому добавление силиката натрия в реакционную смесь приводит к стабилизации и накоплению этих моносахаридов [33]. Кроме того были опубликованы работы, в которых фосфаты моносахаридов получались в реакции монофосфатов глицеральдегида и гликольальдегида. Некоторые комбинации исходных продуктов дали 2-4-дифосфат рибозы в качестве основного продукта [34].

Важно отметить, что во всех перечисленных работах рибоза всегда представляет собой лишь один из компонентов полученной рацемической смеси моносахаридов. К

сожалению, концентрация дезоксирибозы в этих продуктах специально не изучалась; скорее всего, она исчезающе низкая.

Синтез азотистых оснований. Рассмотрим сначала абиогенный синтез пуриновых оснований – аденина и гуанина. Наиболее детально изучен способ получения пуриновых оснований полимеризацией HCN в водных растворах. Хуан Оро с сотрудниками первыми сумели выделить аденин таким способом ещё в 1950-х годах. Впоследствии эта и некоторые тесно связанные с ней реакции были исследованы ещё несколько раз в различных условиях, с использованием более совершенных методик анализа продуктов синтеза. Были обнаружены условия, в которых небольшое количество гуанина тоже обнаруживается среди продуктов реакции [35,36].

При полимеризации HCN сначала образуется тетрамер HCN, диаминоалеодинитрил. Тетрамер затем инициирует следующую реакцию полимеризации, которая заканчивается образованием темного твёрдого вещества неясной природы. Гидролизует этот нерастворимый полимер кислотами или щелочами получают аденин, гуанин и великое множество других молекул, почти не охарактеризованных.

Было исследовано в общей сложности ещё пять способов синтеза аденина с участием тетрамера HCN, но путь, описанный выше, в итоге оказался наиболее правдоподобным (более подробное обсуждение этих реакций имеется в обзоре [9]).

Параллельно с реакцией полимеризации происходит ещё и гидролиз HCN с образованием формамида и, в конечном счете, формиата аммония, в результате чего образование тетрамера оказывается невозможным, если исходная концентрация HCN в растворе ниже 10^{-1} - 10^{-2} М, [37]. Достижение столь высоких концентраций HCN не представляется возможным, так как, ввиду её высокой летучести, пришлось бы насыщать синильной кислотой весь мировой океан. Лесли Оргель с сотрудниками [38] видят выход в том, чтобы океан заморозить и обратить в лёд. При $-24,3^{\circ}\text{C}$ эвтектическая смесь содержит 74.5 % (Мол) HCN.

Получить пиримидиновые основания в абиогенных условиях, как оказалось, намного труднее, чем пуриновые. В большинстве работ, посвящённых абиогенному синтезу цитозина и урацила, исследуются реакции между цианацетиленом или цианоацетальдегидом (являющимся продуктом гидролиза цианацетилена), цианатами, изоцианатами и мочевиной. В результате реакций образуется цитозин, иногда с большим выходом. Урацил получается гидролизом цитозина. Подробности указаны в обзорах [9] и [40]. Сомнения у специалистов вызывают как сама возможность присутствия необходимых ингредиентов на поверхности земли (в особенности цианацетилена и мочевины), так и высокая скорость гидролиза промежуточных продуктов, препятствующая их накоплению в достаточных количествах.

Альтернативный способ получения азотистых оснований был недавно предложен группой из пяти итальянских авторов [39], руководимых проф. Ди Мауро. Эти авторы попросту нагревали формамид до 110 - 160°C в присутствии различных солей и минералов. В продуктах деградации формамида ими были обнаружены различные производные пиримидина, имидазола и пурины. Авторы полагают, что подобный метод синтеза вполне можно считать абиогенным: формамид обнаружен в некоторых примитивных метеоритах, в хвостах комет и в газовой-пылевой оболочке некоторых звёзд. Он, стало быть, мог присутствовать и на поверхности Земли, хотя бы и в малых количествах. За счёт низкой летучести и очень высокой точки кипения, формамид может быть концентрирован упариванием водных растворов практически до 100%.

Синтез нуклеозидов. Соединение рибозы с азотистым основанием посредством образования N-рибозидной связи оказалось наиболее сложным этапом абиогенного синтеза нуклеотидов. Впрочем, для пуриновых оснований особых проблем не возникает.

Реакция протекает в водном растворе в присутствии неорганических солей Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} . Если рибозу и пуриновые основания выдержать в таком растворе при высокой температуре до полного высыхания, то образуется рацемическая смесь α - и β -нуклеозидов с выходом 2-10%, [41]. Однако для рибозы и пиримидиновых оснований аналогичная реакция оказалась неэффективной (выход менее 0.1%).

Альтернативных путей синтеза уридина и цитидина найти не удавалось на протяжении сорока лет. Систематические неудачи заставили многих биохимиков усомниться в самой возможности спонтанного возникновения РНК в природе, [42,40]. Появился целый ряд работ, предлагавших иные, более просто устроенные *информационные полимеры*, из которых РНК должна была образоваться эволюционным путём (о которых речь пойдёт ниже, в разделе 3.2). Однако в 2009 г. β -рибоцитидин-2',3'-циклофосфат получили в лаборатории Дж. Сазерленда, используя новый подход, минуя как рибозу, так и цитозин. Поскольку вещество это является пиримидиновым нуклеотидом, к тому же активированным, синтез его лучше обсудить в следующем подразделе.

Синтез нуклеотидов.

*Одна половинка окна отворилась...
Одна половинка души показалась!
Давай-ка откроем и ту половинку...
И ту половинку окна...*

М. Цветаева

Наиболее очевидный способ получения нуклеотидов заключается в фосфорилировании нуклеозидов. В 60-х годах прошлого века предполагалось, что, в отсутствие нуклеозидтрифосфатов, именно эта стадия синтеза нуклеотидов будет наиболее сложной. В действительности же проблема фосфорилирования нуклеозидов была решена одной из первых [43], и в настоящее время дискуссия скорее может идти о выборе наиболее правдоподобного пути абиогенного фосфорилирования среди многих известных.

Первыми удачно фосфорилирование нуклеозидов выполнили Lohrmann и Orgel, [44], в 1971 году, нагревая в безводных условиях смесь порошков нуклеозидов, гидроксилapatита и мочевины или солей аммония. Основными продуктами были нуклеозид 2',5'- и 3',5'- циклические монофосфаты. Впоследствии были найдены способы осуществить сходные реакции в водных растворах [45,46].

Из более современных работ интересно отметить публикацию упоминавшейся выше пятёрки итальянцев предводительствуемой Эрнесто Ди Мауро [47]. Выдерживая раствор аденозина в формамиде при 90 - 160 °С в присутствии некоторых фосфатных минералов, таких как уреалит (основной фосфат марганца), гидроксил-апатит, фтор-апатит, вивианит (водосодержащий фосфат двухвалентного железа), псевдомалахит (основной фосфат меди) и ряда других, они получили смеси, содержащие аденозинмонофосфаты, в основном циклический 2':3'-аденозинмонофосфат.

Помимо фосфорилирования нуклеозидов, есть ещё один способ абиогенного получения нуклеотидов, открытый недавно и сыгравший важную роль в формировании представлений о возможных путях возникновения жизни.

Как уже было упомянуто в предшествующем разделе, к концу прошлого столетия большинство биохимиков, придя к выводу о невозможности соединить рибозу с пиримидиновыми основаниями, отказались от поисков путей абиогенного синтеза РНК. На первый план вышли поиски новых т.н. *информационных полимеров*, способных, хотя бы в принципе, произвести РНК в результате какой-то собственной своей добиологической эволюции. В 2007 г. J. Sutherland, успевший уже внести лепту в поиски новых информационных полимеров, поставил перед собой и своей лабораторией задачу: либо придумать способ получения пиримидиновых нуклеотидов каким-то новым путём,

менее очевидным, чем непосредственное соединение рибозы с основанием, – либо уж оставить опыты с РНК раз и навсегда. В итоге действительно был обнаружен новый способ синтеза пиримидиновых нуклеотидов, [48,49].

При традиционном подходе к синтезу нуклеотидов, напомним, предполагалось что рибозы и азотистые основания должны быть получены по отдельности, затем соединены гликозидной связью, а фосфорилирование следует проводить на завершающей стадии. Sutherland обратил внимание, что 2-амино-оксазол (**11** на Рис. 3-1 внизу) есть в некотором роде химера из половинки пентозы и половинки азотистого основания. Он решил последовательно добавлять глицеральдегид (**9**) а затем цианацетилен (**7**) как недостающие «половинки», соответственно, пентозы и основания, и тем самым получить арабинозо-ангидронуклеозид (**13**). Таким образом, углеродно-азотная химия оказалась «перемешана» с химией углеродно-кислородной. При этом в реакционную смесь, тоже вопреки установленной традиции, с самого начала был добавлен неорганический фосфат, обычно добавляемый лишь на самой последней стадии синтеза рибонуклеотида. Фосфат действует как буфер и как катализатор в одно и то же время; добавление его на самых ранних стадиях оказалось необходимым.

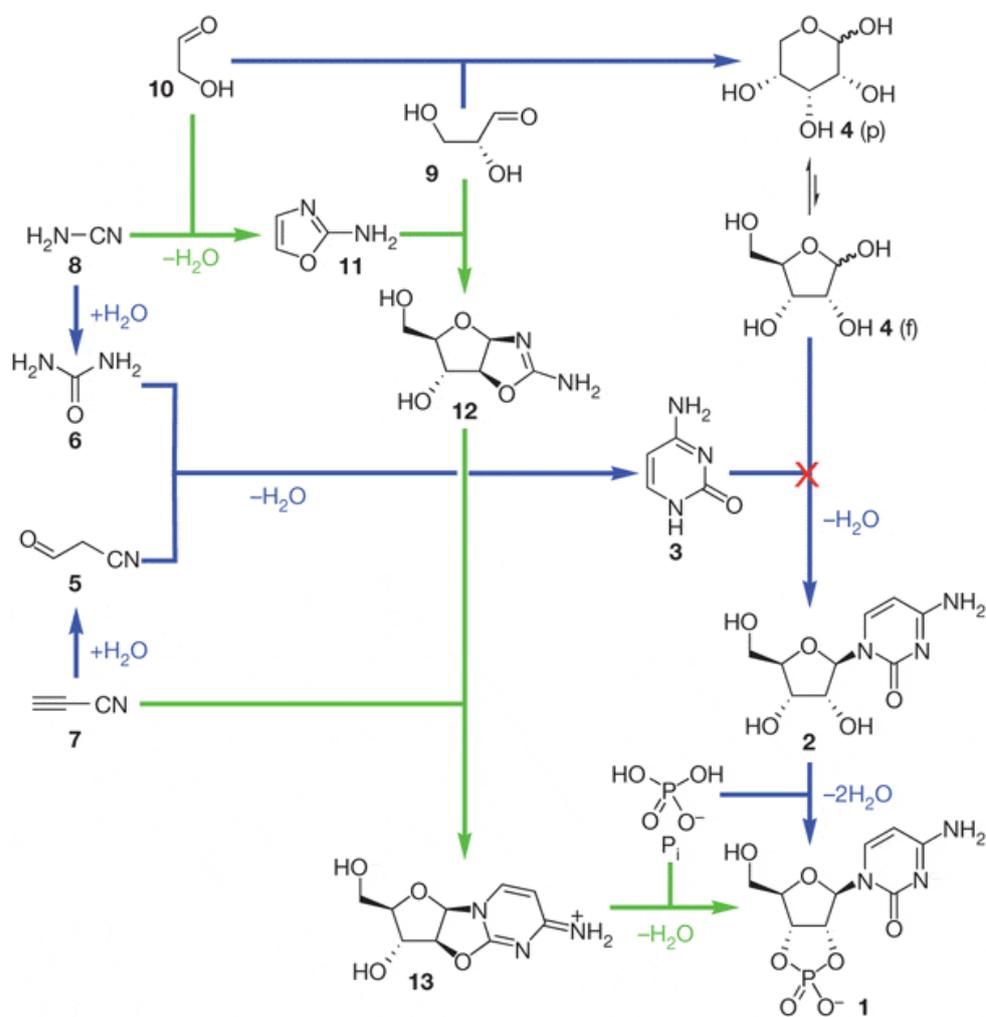


Рис 3-1. Синтез бета-рибоцитидин-2',3'-циклофосфата (**1**) из простейших органических веществ. Синими стрелками показан путь, которым пытались идти раньше. Реакция, оказавшаяся невыполнимой, — соединение рибозы (4) с азотистым цитозином (3) — перечеркнута красным крестиком. Зелеными стрелками показан путь, найденный в [48]. Из работы [48]

Процесс протекает в пять стадий. На последней стадии ангидронуклеозид **13** фосфорилируется с образованием бета-рибоцитидин-2',3'-циклофосфата (**1**),

представляющего собой активированный нуклеотид. Краткое описание работы дано в [48]. Наиболее удивительной авторы считают последнюю стадию – фосфорилирование. Его механизм детально объяснён в [50]. Подробное описание всех стадий реакции и догадки (несколько спекулятивные) о возможных путях их осуществления на земле представлены в [49].

Несмотря на то, что процесс открытый Сазерлендом с соавторами многостадийный и осуществимость его в природных условиях не вполне очевидна, ажиотаж, возникший вокруг этой работы (свидетельством которому публикации и отзывы в *Nature* и *The Times*) оправдан. С её появлением отпали сомнения в принципиальной возможности возникновения мононуклеотидов в каких-то геохимических процессах на ранних стадиях эволюции земли. Вопрос о более конкретной идентификации вероятных путей синтеза мононуклеотидов в природе сам по себе не столь уж важен.

3.2. Моделирование абиогенной полимеризации нуклеотидов и репликации полинуклеотидов.

При обсуждении исследований абиогенного синтеза мононуклеотидов у стороннего наблюдателя возникает ощущение очень сложной задачи, постепенно решаемой по мере накопления экспериментальных данных, с привлечением новых идей. Работы, посвящённые соединению нуклеотидов в полинуклеотиды посредством фосфодиэфирных мостиков, будь то абиогенная полимеризация или репликация ДНК и РНК, производят впечатление прямо противоположное. Попытки получения олигомеров достаточной длины, пригодных для кодирования сколько-нибудь содержательного массива информации, наталкиваются на затруднения фундаментального характера. Усилия, предпринятые с целью обхода затруднений, приводят к обнаружению новых препятствий, тоже принципиального свойства.

Каталитический синтез олигомеров одноцепочечной РНК. Первое затруднение состоит в том, что образование фосфодиэфирных связей происходит с увеличением свободной энергии, вследствие чего ДНК и РНК являются термодинамически неустойчивыми по отношению к реакции гидролиза фосфодиэфирной связи с образованием мономеров [51, 52, 53]. В живых организмах образование фосфодиэфирной связи осуществляется параллельно с разрывом нестабильной фосфоангидридной связи, служащей источником энергии превращения. Здесь изложены результаты различных экспериментов по синтезу полинуклеотидов, в которых авторы пытаются обойти проблему нестабильности фосфодиэфирной связи используя катализаторы, преактивированные нуклеотиды или создавая необычные условия синтеза. (Вопрос об энергетике фосфодиэфирных связей в действительности более сложен. Детальное обсуждение данных о термодинамических свойствах связей в полинуклеотидах и решение вопроса о возможности термодинамической стабилизации полинуклеотидов по отношению к гидролизу и переэтерификации помещены ниже, в главе 10.)

Полинуклеотиды, по крайней мере, в принципе, можно стабилизировать, уменьшив химический потенциал H_2O в системе и увеличив рН. Попытки осуществить эту идею на практике успеха не имели. Так, выпаривание кислых растворов нуклеотидов с последующим нагревом приводит к образованию сложной смеси очень коротких олигонуклеотидов, в которых 2'-5'- и 3'-5'- фосфодиэфирные сочленения распределены более или менее хаотическим образом [54]. Попытки добиться поликонденсации нуклеотидов в водных растворах посредством добавления активирующих агентов, таких как цианамид и водорастворимые карбодиимиды, удачи также не принесли. В лучшем случае удавалось получить димеры или очень короткие олигомеры, [9].

Несколько более успешным оказался альтернативный подход к проблеме получения полинуклеотидов, в котором трудности, связанные с термодинамической нестабильностью фосфодиэфирной связи, пытаются обойти за счёт использования преактивированных нуклеотидов. Нулеозид-5'-полифосфаты (т.е. соединения, подобные АТФ) в водных растворах при умеренных значениях температуры и pH не могут быть использованы для этой цели, поскольку реагируют слишком медленно. В большинстве работ нуклеотиды преактивируют как фосфорамидаты, чаще всего используют фосфоримидозалиды (*phosphorimidazolides*), см. Рис. 3-2, VIII. (Неоднократно высказывались сомнения в правомочности использования таких способов преактивации для абиогенного синтеза.)

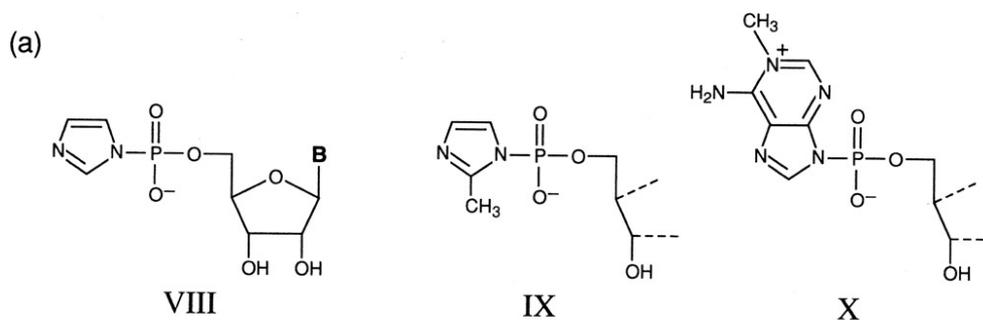


Рис 3-2. Некоторые из активированных нуклеотидов использованные для абиогенного синтеза олигонуклеотидов.

Нуклеозид 5'-фосфоримидазолиды олигомеризуются в водных растворах, однако, в отсутствие катализаторов, образуются только короткие линейные или циклические олигомеры. Ионы металла, в частности Pb^{++} [55,56,57], могут быть использованы для удлинения олигомеров. Был также испробован уранил-ион, оказавшийся наиболее эффективным. Его использование позволяет получить олигонуклеотиды длиной до 16 нуклеотидов, в основном соединённых в положении 2'-5' [58,59].

В лаборатории Джеймса Ферриса [60-65] добились определённых успехов в каталитической олигомеризации нуклеотидов с использованием монтмориллонита – минерала из группы глин с общей формулой $(Na,Ca)_{0.33}(Al,Mg)_2(Si_4O_{10})(OH)_2 \cdot nH_2O$. Работы этой группы, начатые около 1986 г., обращают на себя внимание методической проработанностью деталей. Из тысяч минералов авторы в качестве катализатора выбрали монтмориллонит зная о его способности катализировать многие реакции с участием органических соединений, хорошо изученной, используемой в химической промышленности. Поскольку природные монтмориллониты, как оказалось, не способствовали олигомеризации нуклеотидов, авторы воспользовались известными методиками катионного обмена, посредством которых можно изменить состав одно- и двухвалентных катионов в глинах. Выяснилось, что использование монтмориллонита, в котором катионы заменены на щелочные или щелочноземельные металлы (но не магний), приводит к олигомеризации. Монтмориллониты с катионами, замещёнными на переходные металлы, олигомеризацию ингибируют.

В работах [60-65] было показано, что в нейтральной и слабокислой среде пуриновые и пиримидиновые основания протонируются и сорбируются на отрицательно заряженную силикатную подрешётку монтмориллонита. Сорбция резко падает при $pH > 4$. Выяснилось также, что активированные нуклеотиды связываются с силикатной решёткой сильнее, чем не активированные, видимо потому что несут на себе на единицу меньший отрицательный заряд. Пуриновые нуклеотиды связываются с поверхностью минерала сильнее, чем пиримидиновые. Как бы то ни было, сорбции активированных нуклеотидов на монтмориллонит самой по себе оказалось недостаточно для поликонденсации.

Для получения олигомеров в раствор необходимо добавить карбодиимид (*carbodiimide*) в качестве конденсирующего агента. Длина образующихся олигомеров сильно варьирует в зависимости от условий, типа азотистого основания, способа активирования нуклеотидов. Так, при pH 8 в присутствии карбодиимида (в водной среде) поликонденсация фосфоримидазолидов нуклеотидов с использованием Na-монтмориллонита в качестве катализатора протекает с образованием олигомеров содержащих от 6 до 14 нуклеотидов. Сменив активирующую группу с имидазола на 1-метиладенин (Рис. 3-3), авторы смогли получить олигомеры, содержащие до 40-50 нуклеотидов.

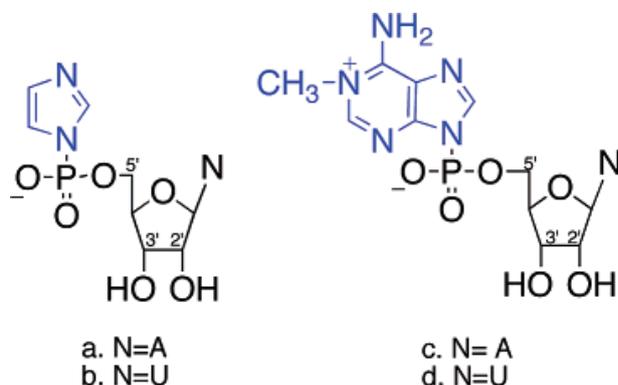


Рис. 3-3. Активированные мономеры нуклеотидов, использованные для поликонденсации нуклеотидов адсорбированных на монтмориллонит: (a) 5'-phosphorimidazole of adenosine (ImpA), (b) 5'-phosphorimidazole of uridine (ImpU), (c) adenosine 5'-phosphoro-1-methyladenine (MeadpA), (d) uridine 5'-phosphoro-1-methyladenine (MeadpU). *Из работы [62].*

Важно отметить, что лишь около 70% нуклеотидов в полученных таким образом олигомерах сочленяются в «биологически значимом» соединении 3'-5' (Рис. 3-4).

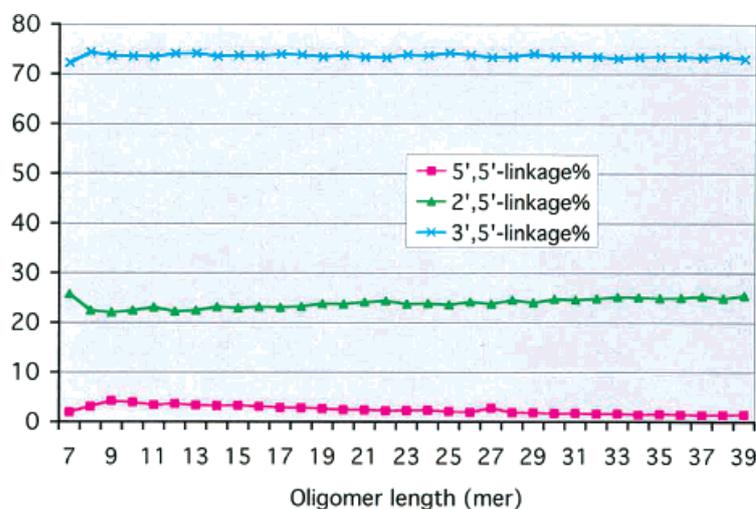


Рис 3-4. Regioselectivity of the bonds formed in the 7- to 39-mers of oligo(A)s as determined by their treatment with RNase T2 followed by APH. *Из работы [62].*

В работе [63] показано, что реакция поликонденсации нуклеотидов, катализируемая монтмориллонитом, проявляет энантиоселективность. Как оказалось, D- и L-энантиомеры активированных нуклеотидов преимущественно соединяются в димеры с образованием пар D- D и L- L. Степень селективности, впрочем, не так велика, но выше чем при конденсации из водных растворов без участия монтмориллонита.

Наибольших успехов в поликонденсации нуклеотидов добились Ди Мауро с сотрудниками [66]. Указанные авторы попросту выдерживали водные растворы

различных нуклеотидов при температуре 40-90° С без каких-либо катализаторов и конденсирующих агентов. В опытах с циклическим 3',5'-гуанозинмонофосфатом (3',5'-ГМФ) были получены олигомеры длиной до 25 нуклеотидов. Наибольший выход таких олигомеров получен при 85° С и концентрации 1 мМ. Опыты с циклическим 3',5'-аденозинмонофосфатом (3',5'-АМФ) в тех же условиях дали олигомеры, содержащие свыше ста нуклеотидов. Реакция поликонденсации резко замедляется с понижением температуры ниже 60 ° С. Возможно по этой причине она и не наблюдалась предшествующими авторами. Кроме того, реакция оказалась специфичной для указанных двух типов нуклеотидов. В аналогичных опытах с циклическими монофосфатами 2',5'-АМФ были получены лишь небольшие олигомеры, до тетрамера. Ациклические АМФ и ГМФ в реакции поликонденсации не вступают. В опытах с 3',5'-УМФ и 3',5'-ЦМФ были получены только небольшие олигомеры, не удлинявшиеся с течением времени.

Пожалуй, наиболее удивительные результаты были получены при исследовании фосфодиэфирных связей в синтезированных олигомерах. Как оказалось, все без исключения нуклеотиды находятся в «каноническом» сочленении 3'-5'. Ещё одно удивительное обстоятельство, вселяющее опасения, состоит в том, что эти сногшибательные результаты почему-то были дружно проигнорированы сообществом профессионалов.

Резюмируя результаты многолетних поисков условий, обеспечивающих спонтанную полимеризацию РНК и ДНК, приходится констатировать, что фундаментальное затруднение, состоящее в термодинамической нестабильности фосфодиэфирной связи, пока преодолено не было.

Матричный синтез двухцепочечных полинуклеотидов (*template-directed synthesis*). При синтезе ДНК и РНК методом получившем название *template-directed synthesis* полинуклеотиды пытаются получить за счёт образования уотсон-криковских пар, выдерживая *матрицу* – одноцепочечную ДНК или РНК – в растворе соответствующих комплементарных нуклеотидов или коротких олигомеров при достаточно низкой температуре (способствующей образованию уотсон-криковских пар). Образование комплементарных комплексов часто сопровождается лигированием нуклеотидов и олигомеров, которое может протекать более или менее эффективно с образованием как 3'-5', так и 2'-5'-фосфодиэфирных соединений.

Работы в данной области имеют своей целью поиск условий эффективного синтеза с преимущественным образованием соединений 3'-5' для как можно более широкого набора подложек. Хотя сами по себе эти эксперименты, видимо, не имеют прямого отношения к прояснению проблемы происхождения жизни, накопленный в них опыт использования конденсирующих агентов, катализаторов и преактивации нуклеотидов и рибонуклеотидов может оказаться полезным и в попытках синтеза нуклеотидов другими методами, в частности в реакции, обсуждаемой ниже, в главе 4. Большое количество данных по матричному синтезу с использованием дезокси-матриц и рибо- и дезокси-субстратов было получено Зуи Шабаровой с соавторами [67]. Матричный синтез олиго-рибонуклеотидов на рибо- и дезоксирибо-матрицах описан также в обзорах [68, 69, 70]. Ниже приведены лишь несколько характерных примеров матричного синтеза, которые понадобятся нам в дальнейшем при обсуждении проблемы хиральности.

Одной из первых найденных эффективных региоспецифичных реакций поликонденсации был синтез олигогуаниловой кислоты на полицитозиновой матрице с использованием преактивированных мономеров гуанозин-5'-фосфоримидазолида (VIII на Рис. 3-2, ImpG). Реакция обнаруживает необычную чувствительность к ионам двухвалентных металлов. В присутствии Mg^{2+} и Pb^{2+} образуются почти исключительно соединения 2'-5', в то время как в присутствии ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} практически все нуклеотиды соединены в положении 3'-5'. Олигомеры имеют длину от 2 до 30 нуклеотидов. В отсутствие Pb^{2+} и Zn^{2+} олигомеры не образуются вовсе. Если использовать

2-метилимидазол вместо имидазола для активирования нуклеотидов (IX на Рис. 3-2; 2-MeImpG), то для протекания реакции достаточно ионов Mg^{2+} . Однако, таким способом можно получить лишь олиго-гуанозин на полицитозине. Для других комбинаций азотистых оснований реакция либо не идёт вовсе, либо получаются очень короткие олигомеры [9].

Проблема хиральности (the homochirality problem) и cross-inhibition phenomena.

Помимо термодинамической нестабильности РНК и ДНК по отношению к гидролизу, есть и другие затруднения принципиального характера, препятствующие их абиогенному синтезу. Наиболее известной из них, несомненно, является *the homochirality problem*. Существование двух энантиоморфных форм рибозы, D и L, из которых только первая встречается в природных молекулах ДНК и РНК, в отсутствие известных механизмов, способных обеспечить столь высокую энантиоселективность, породило грандиозное количество спекуляций и домыслов. Обсуждение их давно вышло за рамки научной дискуссии.

Если словосочетание *the homochirality problem* набрать в любом поисковике, например Google, на экране, прежде всего, появятся десятки теологических сайтов, повествующих вполне наукообразно об энантиоморфизме, и о гомохиральности совершившейся *божественным каким-то изъявленьем*. Есть и группы физиков-теоретиков, в наукообразии не уступающих «божественным», выводящих гомохиральность из каких-то мало понятых свойств энтропии неравновесных открытых систем, *пред коими в смущении никнет ум человеческий*. Есть и туманно-философские повествования о гомохиральности как форме существования всего живого. Как если на планете вдруг сотворится жизнь, то, скорее всего в форме соединений углеродных, и уж конечно гомохиральных.

Британский химик Вильям Боннер писал по этому поводу: *«I spent 25 years looking for terrestrial mechanisms for homochirality and trying to experimentally investigate them and didn't find any supporting evidence.»* Он далее пишет: *«Terrestrial explanations are impotent or nonviable.»* Впрочем, в качестве альтернативного – *extraterrestrial* – механизма Боннер не имел в виду ничего сверхъестественного. Станфордский профессор был убеждённым пропагандистом теории, объяснявшей гомохиральность избирательным разложением органических молекул в лучах ультрафиолета со сферической поляризацией, пришедших в нужный момент на стадии формирования Солнечной Системы от некоей гипотетической нейтронной звезды.

В 2005г. на ускорителе LURE в Orsay, France, были выполнены эксперименты по энантиоселективному фоторазложению кристаллической аминокислоты лейцина в УФ лучах с круговой поляризацией [71]. (Для нуклеиновых кислот данные пока отсутствуют.) Реальность эффекта была подтверждена, однако он оказался не столь значительным. Более того, поскольку молекулы по разному реагируют на разные участки УФ спектра, суммарный эффект был близок к нулю.

Проблема хиральности приобрела несколько неожиданное, драматическое развитие в середине 1980-х гг. при попытках экспериментального моделирования процесса спонтанной репликации РНК. Напомним, в теории мира РНК предполагается, что первоначальная молекула РНК возникла спонтанно в водном растворе нуклеотидов. Затем, в силу каких-то причин, она подверглась репликации, тем самым запустив механизм добиологической эволюции.

Очевидно, раствор нуклеотидов, в котором протекали синтез и репликация исходной РНК, не мог быть гомохиральным. Если предположить, что процесс абиогенной репликации проявляет энантиоселективность, то этим в принципе можно попытаться объяснить гомохиральность современной РНК. Она, например, могла бы возникнуть вследствие многократного концентрирования исходной смеси слегка обогащённой одним из двух энантиомеров рибозы (т.н. *chiral amplification*).

В 1984 г. группой из шести биохимиков было предложено использовать процесс матричного синтеза РНК в качестве модели её спонтанной репликации, [72]. Авторы попытались осуществить матричный синтез РНК на гомохиральную матрицу в рацемическом растворе нуклеотидов. Если этот процесс окажется энантиоселективным, то, полагали авторы, разумно предположить энантиоселективность спонтанной репликации исходной РНК. Неожиданным образом, результаты этих экспериментов привели к обнаружению ещё одной фундаментальной проблемы в теории мира РНК.

Схема опытов повторяла описанную выше поликонденсацию гуанозин 5'-2-метилимидазола (2-MeImpG) на poly(C)-матрицу с единственным (существенным) отличием: вместо D-нуклеотидов была взята рацемическая смесь D- и L-нуклеотидов. В экспериментах L-2-MeImpG действительно соединялся с poly(D-C) менее охотно, чем D-2-MeImpG, но, соединившись с матрицей, L-2-MeImpG блокировал дальнейшее удлинение олигомера. В итоге олигомеры получались не длиннее 8 нуклеотидов (против 30 при конденсации монохирального D-2-MeImpG). Явление это, получившее название *enantiomeric cross-inhibition* было также продемонстрировано на примере конденсации ImpG на poly(D-C)-матрицу катализируемой ионами Zn^{2+} , причём эффект был выражен даже более отчётливо. В силу *enantiomeric cross-inhibition*, спонтанная репликация РНК оказывается невозможной при наличии обоих энантиомеров в растворе, т.к. конденсация одного из энантиомеров ингибируется в присутствии другого.

Объяснение явления *enantiomeric cross-inhibition* было предложено в работе [73], появившейся через три года после его обнаружения. Авторы обратили внимание, что, D-мононуклеотиды в *anti* конформации структурно гомологичны L-мононуклеотидам в *syn* конформации, и это должно приводить к образованию комплементарных пар аналогичных уотсон-криковским, Рис. 3-5. Впоследствии Джойс [40] называл это явление «диковинным выкрутасом химии нуклеотидов» (*a strange twist of nucleotide chemistry*). Авторы [73] полагают, что L-гуанозин встраивается в poly(D-C) с образованием комплементарной пары. Встраивание L-нуклеотида препятствует нормальному скручиванию РНК в двойную спираль, а это блокирует дальнейшую конденсацию.

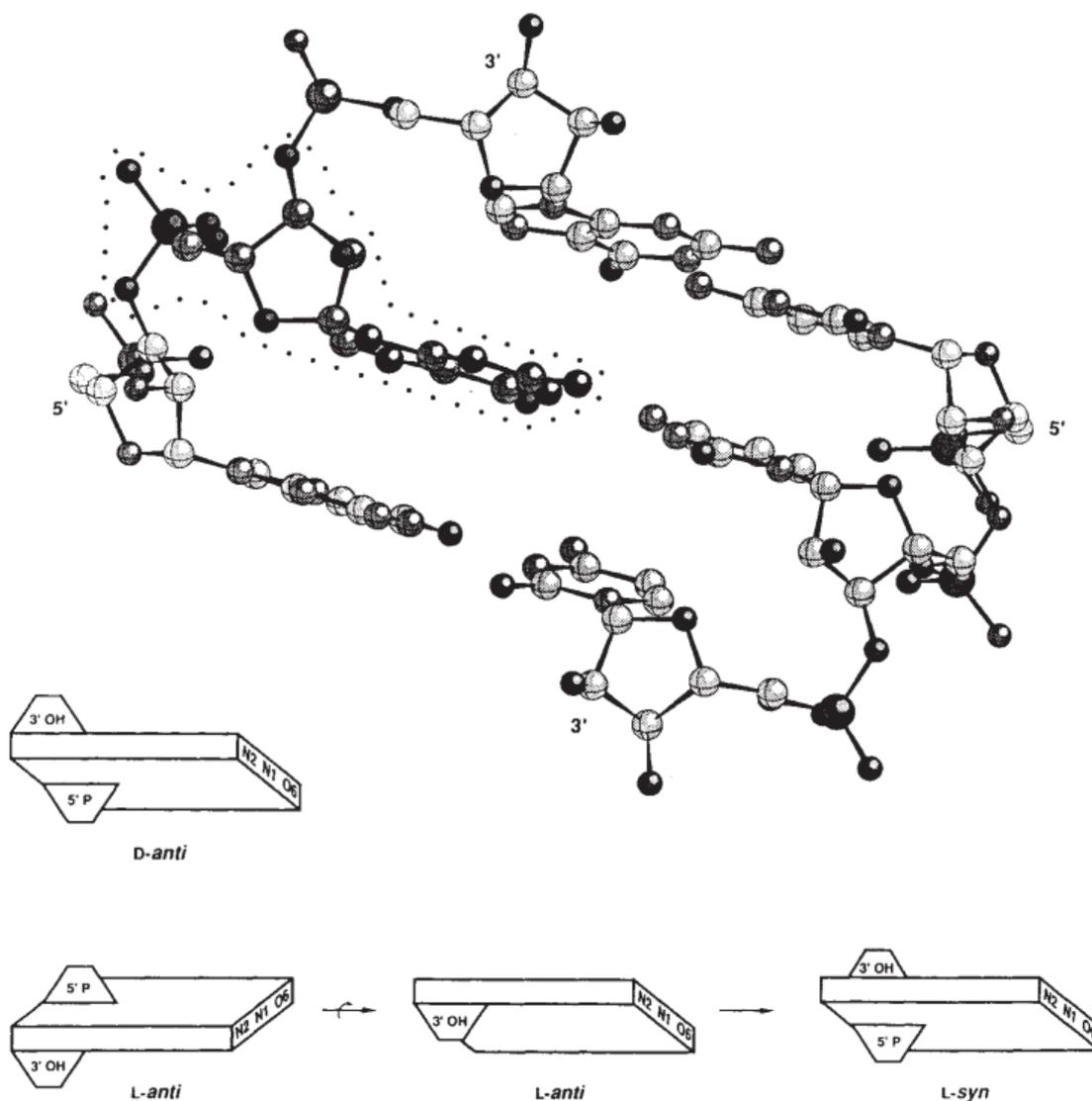


Рис 3-5. Объяснение *enantiomeric cross-inhibition* предложенное авторами [73]: D-моонуклеотиды в *anti* конформации структурно гомологичны L-моонуклеотидам в *syn* конформации. *Вверху*: three successive guanosine-cytosine pairs of the A-form of RNA projected onto a plane perpendicular to the diad axis. The middle guanosine residue is enclosed in a dotted box. Atom coordinates are based on the crystal structure of A-RNA, [80]. *Внизу*: the close structural homology between D-*anti* and L-*syn* guanosine mononucleotides when bound to a complementary template. The D-*anti* form corresponds to the middle guanosine residue shown above. Imagine reflecting this in a mirror to produce the L-*anti* form, which is rotated about its long axis to orient the base for complementary pairing and finally rotated about the glycosidic bond to produce the L-*syn* form. *Из обзора* [40].

Обнаружение явления *enantiomeric cross-inhibition* и его последующее обсуждение имело большой резонанс, как в научной среде, так и за её пределами. Большинство занятых в этой области биохимиков, разуверившись в самой возможности самопроизвольного возникновения РНК в природе, занялись дизайном и синтезом других, более простых гетерополимеров, как они полагают, предшествовавших РНК на более ранних стадиях добиологической эволюции. Об этих исследованиях ещё пойдёт речь ниже. «Божественные» блогеры комментируют обсуждаемые здесь работы [72,73] как «крах неodarвинизма» (они, оказывается, следят за публикациями в реферируемых изданиях). Один американский микробиолог указывает в своём сайте на работу [72] как на первопричину «побудившую его перейти из атеистов в деисты».

В последовавших публикациях феномен *enantiomeric cross-inhibition* в целом был подтверждён, но и были внесены коррективы. Наиболее полная картина вырисовывается из данных представленных в [74]. Авторы этой работы осуществляли олигомеризацию D-,

L- и рацемического гуанозин-5'-фосфо-2-метлимидазола на матрицы длиной в десять нуклеотидов состоящие из D- и L-дезокситидилата.

В одной серии экспериментов авторы выдерживали олигомеры $d(C_{10})$ (используемые в качестве матрицы) в растворах D-2-MeImpG, L-2-MeImpG и в эквимольной смеси D-2-MeImpG с L-2-MeImpG. Результаты вполне соответствовали описанным выше данным работы [72].

Однако картина изменилась, когда, в другой серии опытов, авторы использовали гетерохиральные олигонуклеотиды в качестве матрицы (в предшествовавших им работах использованы были только D-матрицы). Оказалось, что если заменить один или два примыкающих dC нуклеотида в середине матрицы $d(C_{10})$ на L-dC, то олигомеризация D-2-MeImpG осуществляется по всей длине матрицы, хотя и с невысоким выходом. Помещение трёх примыкающих L-нуклеотидов в середине матрицы блокирует олигомеризацию. При использовании матрицы из чередующихся D- и L-нуклеотидов олигомеризации тоже не происходит. Авторы пришли к выводу, что встраивание отдельных L-нуклеотидов в ДНК или РНК, состоящую преимущественно из D-нуклеотидов, принципиальных затруднений для спонтанной репликации не создаёт.

Подводя итог, в свете данных работы [74] явление *enantiomeric cross-inhibition* не создаёт принципиальных затруднений для спонтанной репликации РНК, когда и матрица, и раствор существенно обогащены одним из олигомеров. Однако механизм, обеспечивающий возникновение таких смесей, пока не найден. Тем самым синтез РНК из смесей, содержащих обе энантиомерные формы нуклеотидов в значительных количествах, представляется крайне затруднительным. Отметим, все эти выводы имеют смысл лишь в предположении, что процесс, именуемый матричным синтезом, может быть использован в качестве модели процесса спонтанной репликации родоначальной РНК. Тем самым, обсуждаемые затруднения, связанные с *enantiomeric cross-inhibition*, лишь показывают, что матричный синтез не моделирует интересующего нас процесса.

В самом деле, правильная репликация РНК предполагает соединение фосфодиэфирными связями лишь тех нуклеотидов, которые образовали уотсон-криковские пары с нуклеотидами матрицы. Все остальные возможные пары нуклеотидов отбраковываются. Использование матричного синтеза в качестве модели спонтанной репликации РНК предполагает, что принцип отбраковки *всецело* определяется гомологией водородных связей в уотсон-криковских парах, и отсутствием таковой во всех остальных парах нуклеотидов. Невозможность осуществления матричного синтеза из рацемических смесей нуклеотидов означает поэтому, что при спонтанной репликации РНК в природе, в дополнение к гомологии водородных связей, действовал какой-то ещё механизм отбора. Успешная теория Происхождения обязана такой механизм предъяснить.

Механизм явления *enantiomeric cross-inhibition*. Предложенное в работе [73] объяснение, согласно которому обсуждаемое явление есть результат встраивания L-нуклеотидов в двойную спираль с образованием гомологичных пар, аналогичных уотсон-криковским, в которых L-мононуклеотиды в *syn* конформации гомологичны D-мононуклеотидам в *anti* конформации, воспроизведённое в ряде современных обзоров, в действительности является сугубо умозрительным. В то же время в литературе имеются независимые экспериментальные данные о строении гетерохиральных двухцепочечных ДНК/ДНК- и ДНК/РНК- олигомеров, накопленные в процессе поисков новых методов терапии опасных заболеваний, основанных на способности ДНК избирательно связываться с комплементарными ей РНК и ДНК (т.н. *antisense therapy*). В этих исследованиях один или несколько нуклеотидов в двухцепочечных D-олигомерах заменяются соответствующими L-энантиомерами (с тем, чтобы повысить устойчивость молекулы к действию нуклеаз).

Гетерохиральные полинуклеотиды во всех таких исследованиях получают по одной схеме: сначала синтезируют два комплементарных одноцепочечных олигомера, затем

олигомеры спаривают, смешивая эквивалентные их количества в водном растворе при достаточно низкой температуре. В простейших случаях, когда одна из цепочек представляет собой D-олигомер, а другая – комплементарный ей L- олигомер, об образовании водородных связей (уотсон-криковских пар) можно судить по тому, имеет ли место спаривание. В более сложных экспериментах, когда обе комплементарные цепочки содержат L- и D- нуклеотиды, полученные продукты исследуют методами УФ-денатурации (UV melting), спектроскопии кругового дихроизма (CD spectroscopy), ЯМР, гель-электрофореза. В отдельных исследованиях выводы о структуре связей подтверждены избирательным разложением продуктов под действием ряда ферментов. К настоящему времени имеются лишь два исследования, [79] и [80], в которых методами ЯМР надёжно установлено образование водородных связей в парах $d(A/T_L)$ или $d(G_L/C)$. В других работах вывод о наличии таких связей делается по аналогии, на основании сходства кривых УФ-денатурации, и спектроскопии кругового дихроизма. Имеется одна публикация, [81], в которой, ввиду отсутствия такого сходства, делается вывод об отсутствии гомологии в паре $d(A_L/T)$.

При соединении гомохиральных цепочек обнаружилось, что олигомеры «отличают» ДНК от РНК. Так, гомохиральный гексамер L- дезоксиаденозина, $L-(dA)_6$, связывается с $poly(U)$, но не связывается с $poly(A)$, $poly(G)$, $poly(C)$ или $poly(dT)$, [75]. Аналогичным образом, $L-(U)_{12}$ и $L-(dU)_{20}$ связываются с $poly(A)$ и не связываются с $poly(dA)$, [76]. Закономерность эта отчётливо просматривается лишь для олигомеров, состоящих из нуклеотидов одного типа. Если L- ДНК олигомер содержит все четыре нуклеотида, то гибридизации не происходит ни с комплементарной ему ДНК – ни с комплементарной РНК, будь то в параллельной ориентации или в антипараллельной, [77].

Гибридизация, как правило, имеет место, если взять два комплементарных D- олигомера и в одном из них поменять один или два примыкающих нуклеотида на соответствующий L- энантиомер. Например, в работе [78] было показано, что гомохиральные D- ДНК гептамер $5'-d(CGTCACGC)-3'$ и D- РНК гептамер $5'-(CGUACGC)-3'$, каждый, связывается как с $5'-d(GCGT_LACG)-3'$, так и с $5'-(GCGU_LACG)-3'$. Аналогичным образом в работе [79] был получен ДНК-олигомер $d(GCGT_LGCG)/d(CGCACGC)$. В работе [80] комплементарный себе самому ДНК- додекамер $5'-d(CGCGAATTTCGCG)-3'$ успешно связывался со следующими пятью гетерохиральными копиями самого себя (в каждой из копий один D- нуклеотид заменён на аналогичный L- нуклеотид): $5'-d(CGC_LGAATTTCGCG)-3'$, $5'-d(CGCG_LAATTTCGCG)-3'$, $5'-d(CGCGA_LATTTCGCG)-3'$, $5'-d(CGCGAATT_LCG)-3'$ и $5'-d(CGCGAATTTCG_LCG)-3'$.

В литературе встречаются упоминания и более сложных экспериментов, в которых хиральность меняли не только в одном, но и в двух или трёх примыкающих нуклеотидах одной цепи ДНК. Высказывалось мнение, что смена хиральности в одном или двух примыкающих нуклеотидах не приводит к существенным искажениям двойной спирали, однако замена трёх следующих подряд нуклеотидов на соответствующие L- энантиомеры сопровождается разрывом водородных связей в уотсон-криковских парах. В общем случае такой закономерности, скорее всего, нет. Авторы [81], например, пришли к выводу, что в некоторых олигомерах D- ДНК замена даже одного нуклеотида на его L- аналог (в данном случае это была пара $d(A/T)$) сопровождается разрывом водородных связей.

В целом способность гетерохиральной пары нуклеотидов к образованию уотсон-криковской пары определяется не только составом самой пары, но и её окружением в двойной спирали. Например, авторы [81] пришли к заключению, что каждый из двух гетерохиральных олигомеров $5'-d(CGGCA_LAGCGC)-3'$ и $5'-d(CGGCAA_LGCGC)-3'$

связывается с комплементарным (им обоим) олигомером 3'-d(GCGCTTGCCG)-5' с образованием типичной спирали В-ДНК, но водородных связей в парах d(A_L/T) ни в том, ни в другом случае не возникает. Поскольку существование олигомеров с гомологичными парами d(A/T_L) было доказано ранее, авторы делают вывод, что гетерохиральная пара d(A_L/T), будучи вставлена в гомохиральный D-олигомер, отличается по своим свойствам от пары d(A/T_L), являющейся её зеркальным отражением.

В тех случаях, когда при встраивании гетерохиральной пары в двойную цепочку образование водородных связей имеет место, гетерохиральные пары оказываются менее стабильными, чем их гомохиральные аналоги. Согласно данным, полученным в экспериментах по УФ денатурации, замена хиральности одного из нуклеотидов в двойных спиралях понижает температуру денатурации (T_m) на несколько градусов для ДНК-олигомеров и на 10-15 градусов для олигомеров РНК, [78-82]. (Данные разных авторов для ДНК сильно разнятся, но ΔT_m никогда не превышает 10° С). Тем самым, гетерохиральность дестабилизирует структуру двойной спирали, но незначительно. Для сравнения, при единичных нарушениях принципа комплементарности уотсон-криковских пар (т.н. *mismatches*) в двухцепочечных олигомерах ДНК, температура денатурации понижается более чем на 20°С, [83].

Разумно предположить, что некоторая дестабилизация, привносимая гетерохиральными уотсон-криковскими парами и была причиной явления, названного *enantiomeric cross-inhibition*, в котором, напомним, встраивание L- нуклеотида блокировало матричный синтез D-РНК, [73,72,74]. В любом случае, механизм, предложенный авторами [73] для его объяснения следует признать ошибочным.

Напомним, авторы [73] объясняли *enantiomeric cross-inhibition* как результат встраивания L- нуклеотидов в двойную спираль с образованием гомологичных пар, аналогичных уотсон-криковским, в которых L-моноклеотиды в *syn* конформации гомологичны D-моноклеотиды в *anti* конформации. Такие пары, полагали авторы, должны препятствовать скручиванию олигомера в двойную спираль. Детальные спектроскопические исследования показали, что в действительности встраивание L- нуклеотидов *никогда* не препятствует образованию двойных спиралей: гетерохиральные ДНК/ДНК комплексы имеют структуру В-ДНК, а РНК/ДНК и РНК/РНК комплексы близки по структуре к А-ДНК, [75-81].

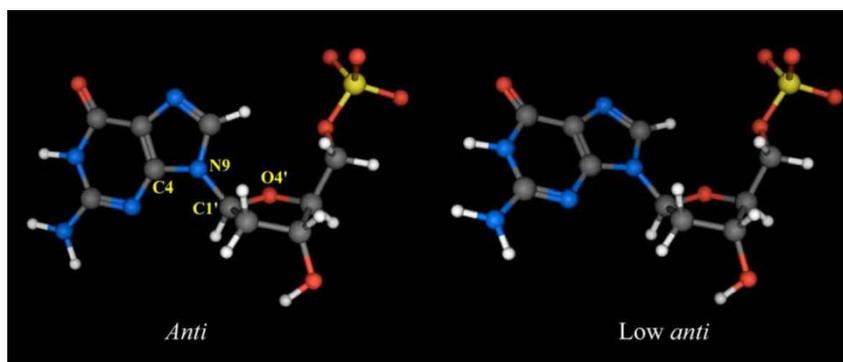


Рис 3-6. Structures of L-deoxyguanosine 5'-monophosphate with the anti ($\chi = 135^\circ \pm 30^\circ$, left) and low anti ($\chi = 180^\circ \pm 30^\circ$, right) glycosyl conformations. χ is defined by a torsion angle of C4-N9- C1'-O4'.

Из работы [80].

Предположение авторов [73] о необычной гомологии между L- и D- моноклеотидами (см. Рис. 3-5) тоже оказывается ошибочным. Детальный анализ спектров ЯМР (на ядрах

¹H) показал, что встраивание L- нуклеотида в D- ДНК приводит к образованию классической уотсон-криковской пары, будь то для пары d(A/T_L) или d(G_L/C), [79, 80]. В обеих парах L- нуклеотид обнаружен в *anti*-конформации с углом $\chi \approx 180^\circ$, Рис. 3-6. (Угол χ определяется как угол поворота вокруг гликозидной связи; это угол C₂-N₉-C₁'-O₄' для пуриновых нуклеотидов и угол C₂-N₁-C₁'-O₄' для пиримидиновых). Urata с соавторами, [80], называют эту необычную конформацию *low anti glycosil conformation*. Авторы полагают, *anti*-конформация L- нуклеотида с углом $\chi \approx 180^\circ$ возникает вследствие необходимости удерживать на максимальном удалении атомы кислорода O₄' соседних нуклеотидов цепочки так, чтобы при этом сохранялась гомология азотистых оснований в уотсон-криковской паре. Схема участка двойной спирали, содержащего уотсон-криковскую пару d(G_L/C), показанная на Рис. 3-7 (построенной авторами на основании данных ЯМР), даёт наглядное представление об этой конфигурации.

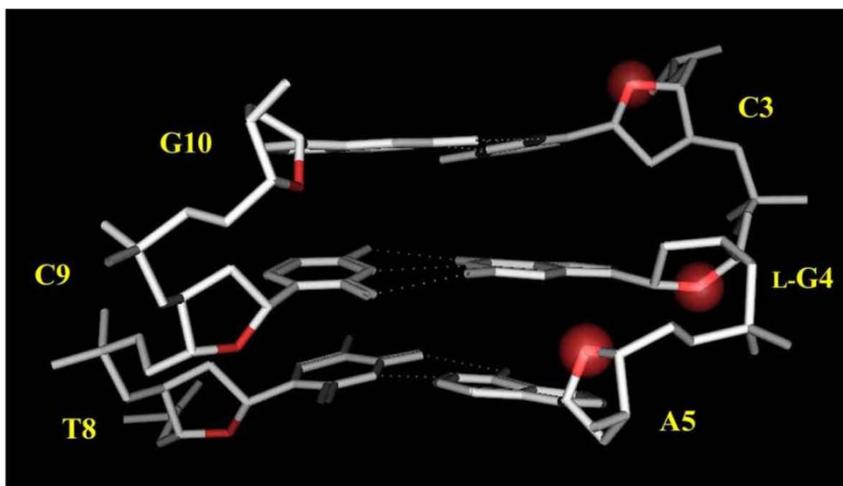


Рис 3-7. Фрагмент двойной спирали ДНК с гетерохиральной уотсон-криковской парой d(G_L/C). (Model structure of L-4. Protons and the residues other than C3, L-G4, A5 are omitted for clarity. The O4' atoms of the C3, L-G4, A5 residues are highlighted with a red sphere.) Из работы [80].

Во всех публикациях, обсуждённых выше, гетерохиральные олигомеры ДНК и РНК содержали гетерохиральные уотсон-криковские пары. В работах [84,85] исследован ещё один тип гетерохиральных олигомеров ДНК – гетерохиральные спирали, состоящие из гомохиральных пар нуклеотидов, такие как d(C^{m8}GCGC_LG_LCGCG)₂ (здесь символом ^{m8}G обозначен 8-метилгуанин). Указанными авторами были синтезированные молекулы ДНК, состоящие из блоков L-нуклеотидов d(C_LG_L/G_LC_L), окаймлённых с флангов гомохиральными блоками, состоящими из D- нуклеотидов. Такие молекулы оказались вполне стабильны. Температура денатурации лишь на 5 градусов ниже таковой в соответствующих гомохиральных олигомерах. При этом получаемые двойные спирали обнаруживают большое разнообразие структур. Указанный выше олигомер, например, в растворе имеет структуру левозакрученной спирали Z₄-B₂*-Z₄, где Z обозначает уотсон-

криковскую пару со структурой Z-ДНК, а символом В* означено зеркальное отражение уотсон-криковской пары со структурой В- ДНК. (Напомним, в норме, при использовании только D-нуклеотидов, Z- ДНК является левозакрученной, а В- ДНК – правозакрученной.) Сходный олигомер $d(^mCG^mCGC_LG_L^mCG^mCG)_2$ при тех же условиях (0.1 М NaCl, символом ^mС обозначен 5-метил цитозин) сворачивается в правозакрученную спираль В-ДНК.

Подводя итог, вхождение нуклеотидов разной хиральности в одну двухцепочечную молекулу ДНК или РНК приводит к некоторой дестабилизации, но в целом не создаёт каких-либо фундаментальных проблем, делающих образование такой молекулы принципиально неосуществимым. Трудности с получением гетерохиральных молекул в процессах матричного синтеза (явление, получившее название *enantiomeric cross-inhibition*) свидетельствуют лишь, что матричный синтез не может быть моделью процесса абиогенной репликации полинуклеотидов. Иначе говоря, гомологии водородных связей в уотсон-криковских парах самой по себе не достаточно для успешного осуществления репликации. Тем самым, теория Происхождения должна предъявить принцип, действующий наряду с гомологией уотсон-криковских пар, обеспечивающий синтез и репликацию полинуклеотидов из рацемических смесей нуклеотидов.

Комбинаторный взрыв. Из всех препятствий, с которыми сталкиваются биохимики в попытках осуществить абиогенные синтез и репликацию полинуклеотидов, наиболее сложным признается затруднение, проистекающее от способности нуклеотидов соединяться многими разными способами между собой. Затруднение это усугубляется ещё более ввиду присутствия в продуктах реакции, при всех мыслимых путях абиогенного синтеза нуклеотидов, большого количества посторонних нуклеотидоподобных молекул, [9,15,40]. Вне зависимости от метода получения рибоз, например, в продуктах реакции в больших количествах должны присутствовать различные тетразы, пентозы и гексозы. Неизбежно также образование сложной смеси моно- и полифосфатов на стадии фосфорилирования. На стадии поликонденсации активированных нуклеотидов произведённое фантастическое разнообразие подобных нуклеотидам молекул начинают соединяться в самых разных сочленениях. Остаётся неясным, как первозданная РНК могла бы возникнуть из этого хаоса, не имея «в услужении» ни ферментов (или рибозимов) – ни химиков-профессионалов. Причём все нуклеотиды должны быть представлены D-энантиомерами, все должны быть β-аномерами и, что особенно удивительно, все должны быть ориентированы в одном направлении 3'→5' без инверсии (т.е. без смены ориентации на 5'→3' с образованием сочленений 3'-3' или 5'-5', см. ниже). Указанные трудности усугубляются ещё в большей степени при спонтанной репликации РНК.

Помимо уотсон-криковских пар известно более 20-ти относительно устойчивых пар нуклеотидов, (Рис 4-4), некоторые из которых оказываются термодинамически устойчивее уотсон-криковских. Устойчивые пары с (стандартными) нуклеотидами образуют и многие модифицированные нуклеотиды, например α-аномеры.

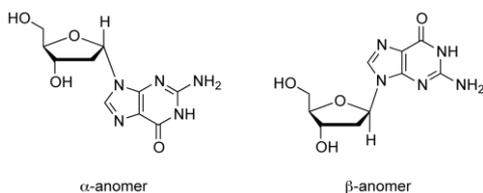


Рис 3-8. Конфигурация гликозидной связи в α- и β-аномерах нуклеозидов.

Гликозидная связь в нуклеотидах может иметь одну из двух конфигураций – α или β, Рис. 3-8. Среди природных нуклеотидов и нуклеозидов обнаруживаются только β-

аномеры. Синтезированные α -аномеры обнаруживают способность образовывать гомологичные пары как с природными β -аномерами, так и с синтетическими α -аномерами, [537]. Специфичность гомологии уотсон-криковских пар при этом сохраняется, но α - β пары имеют параллельную ориентацию, а пары α - α ориентированы антипараллельно, подобно β - β уотсон-криковским парам природных нуклеотидов. Были получены олигомеры двухцепочечных полинуклеотидов ДНК в форме α - β и β - β , [537], а также смешанные двухцепочечные олигомеры, содержащие пары α - β наряду с β - β , [671,672]. Замена одного β -нуклеотида на его α -аномер сопровождается инверсией ориентации фосфодиэфирной связи. Такие пары должны были бы образовываться и при спонтанной репликации первозданной молекулы РНК.

В структуре двухцепочечных полинуклеотидов, как хорошо известно, все фосфодиэфирные связи ориентированы в одну сторону, все находятся в конфигурации $3' \rightarrow 5'$, все нуклеотиды представляют собой β -аномеры, все являются D-энантиомерами. Остаётся неясным, каким образом процесс спонтанной репликации мог бы привести к возникновению такой молекулы в растворе, содержащем α - и β -аномеры D- и L-энантиомеров нуклеотидов.

Судя по тону более современных статей и обзоров, именно комбинаторный взрыв рассматривается специалистами в наши дни как главное, совершенно непреодолимое препятствие для абиогенных схем синтеза и репликации РНК.

Альтернативные генетические системы. К середине 1980-х гг. лишь несколько исследователей продолжали поиски особых условий, в которых могло бы произойти спонтанное возникновение РНК. Подавляющее большинство специалистов (см. например [9,15,40]) полагают такое развитие событий совершенно невероятным в силу принципиальных затруднений изложенных выше. На первый план вышли поиски гетерополимеров родственных РНК, способных к саморепликации, но состоящие из мономеров, не способных соединяться многообразными способами. В этих исследованиях постулируется, что исходная молекула РНК и мир РНК возникли в результате добиологической эволюции некоей молекулы-предшественницы, родственной РНК, но более просто устроенной, возможно ахиральной.

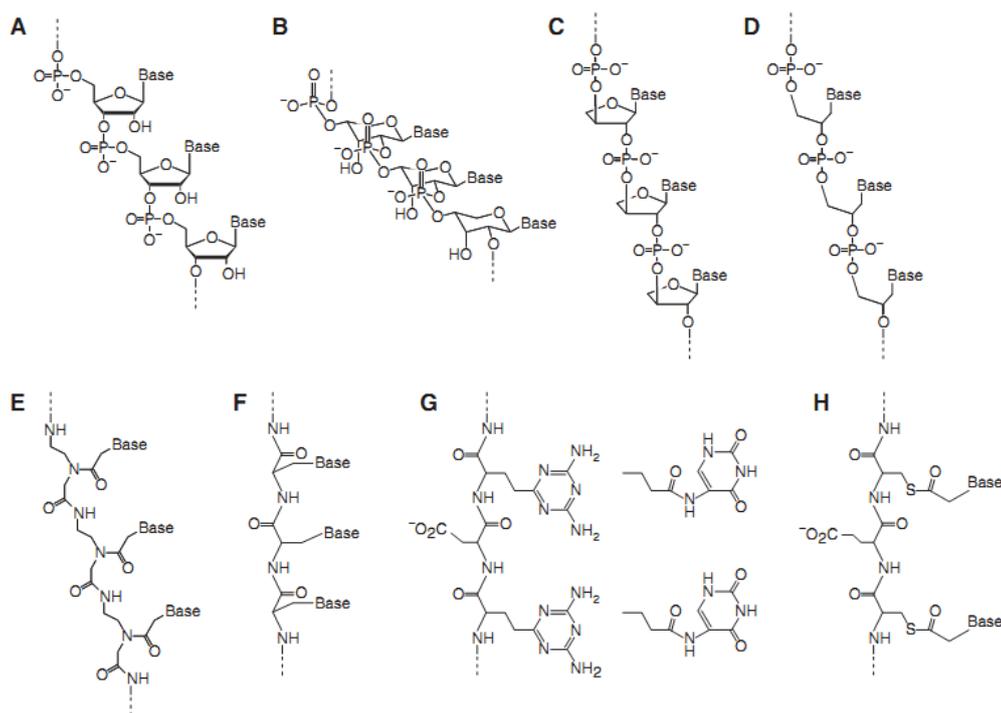


Рис 3-9. Информационные полимеры, предложенные в качестве возможных предшественников РНК. The structures of (A) RNA; (B) p-RNA; (C) TNA; (D) GNA; (E) PNA; (F) ANA; (G) diaminotriazine-tagged (left) and dioxo-5-aminopyrimidine-tagged (right) oligodipeptides; and (H) tPNA. ANA contains a back-bone of alternating D- and L-alanine subunits. The diaminotriazine tags are shown linked to a backbone of alternating L-aspartate and L-glutamate subunits; the dioxo-5-aminopyrimidine tags (shown unattached) can be linked similarly. tPNA is shown with a backbone of alternating L-cysteine and L-glutamate subunits

В настоящее время в литературе обсуждается целый ряд возможных «претендентов» на роль предшественников РНК. Сначала биохимики исследовали аналоги нуклеиновых кислот, в которых рибоза заменена на другой сахар или же фуранозная форма рибозы заменена на пиранозную. Затем появились и пептиднуклеиновые кислоты, аланилнуклеиновые кислоты и многие другие, Рис. 3-9. Некоторые из описанных гетерополимеров обнаруживают интересные свойства, в том числе и способность к образованию гомологических пар, аналогичных уотсон-криковским, и способность к саморепликации, и способность скручиваться в двойные спирали, более стабильные, чем ДНК. Обзор этих исследований имеется в [86].

3.3. Теории, отводящие особую роль кристаллам.

Помимо исследований, выполненных в рамках представлений о мире РНК, был также высказан ряд версий, не укладывающихся в мейнстрим, большинство из которых в той или иной форме постулирует участие кристаллических фаз в возникновении жизни. Ряд авторов полагают возможным появление жизни на поверхности кристаллов минералов. Первым эту гипотезу высказал ирландский исследователь Дж. Бернал в работе [197], опубликованной в 1949 г. Данный автор полагал, что исходные биоорганические молекулы, из которых возникла жизнь, вероятно, были адсорбированы на частичках глины, так как иначе они бы рассеялись в мировом океане и не имели бы шансов вступить в химические взаимодействия друг с другом. Впоследствии адсорбция биомолекул кристаллами исследовалась различными авторами в связи с проблемой происхождения жизни, как экспериментальным путём, так и теоретическими методами. Из них наибольший интерес представляют работы [309] и [378], посвященные адсорбции нуклеотидов и аминокислот гидроксилпатитом, обсуждаемые ниже в разделах, соответственно, 6.3.8 и 6.3.7.1. Обзор современного состояния (на 2006 г.) исследований, отводящих первостепенную роль поверхности кристаллов в происхождении жизни, имеется в [627].

Особняком среди работ, связывающих происхождение жизни с кристаллами, стоят публикации Э. Костецкого [120,458]. Этот автор полагает, что жизнь возникла внутри кристаллов апатита (а не на их поверхности). Э. Костецкий обратил внимание на сходство в расположении тетраэдров PO_4 в структуре гидроксилпатита с расположением фосфатных групп в структуре Z-ДНК. С чисто геометрической точки зрения, двойная спираль Z-ДНК может быть вставлена в структуру апатита, так что ось спирали располагается вдоль гексагональной оси структуры кристалла, а фосфатные группы полинуклеотида занимают позиции тетраэдров PO_4 кристалла. При этом расстояние от атома P до оси спирали оказывается близким к 9 \AA , как в Z-ДНК. Шаг спирали, в Z-ДНК равный 44.6 \AA или 12 пар нуклеотидов, соответствует высоте 6 элементарных ячеек (43.3 \AA).

Согласно представлениям Э. Костецкого, жизнь возникла в результате многократной перекристаллизации апатита, захватывавшего молекулы нуклеотидов и аминокислот. Взаимодействие этих молекул внутри кристалла каким-то образом привело к возникновению биополимеров – полинуклеотидов и полипептидов. Сам кристалл в этом гипотетическом процессе постепенно утратил трансляционный дальний порядок и

приобрёл ориентационный порядок, характерный для жидкого кристалла. Тело «твердое» переплотилось в «мягкое» и, в конечном счете, в живую клетку.

Ни в одной из своих публикаций Э. Костецкий не поясняет, каким образом его гипотетический процесс, поистине не имеющий аналогов в химии твёрдого тела и жидких кристаллов, мог бы осуществиться. Вероятно по этой причине данный автор, опубликовавший за 30 лет серию статей похожего содержания, так и не обрёл последователей. По крайней мере, некоторые из обнаруженных им геометрических соответствий расположения тетраэдров PO_4 в апатите с расположением фосфатных групп в Z-ДНК представляют собой не более чем случайное совпадение. Спиральная структура ДНК, согласно современным представлениям, возникает при активном участии молекул H_2O (см. ниже, раздел 10.4.2). При физиологических условиях стабильна правозакрученная двойная спираль В-ДНК. При высоких концентрациях электролитов стабилизируется левозакрученная Z-форма. Однако в структуре апатита молекулы H_2O отсутствуют вовсе, а о структуре ДНК в таких условиях пока ничего не известно. Тем не менее, идея Э. Костецкого о возможности соотношения длин связей в ДНК (или РНК) с межатомными расстояниями в апатите представляется важной и интересной.

Представление о том, что фосфатные группы ДНК (или РНК) и тетраэдры PO_4 апатита – это практически одно и то же, обнаруживается уже в работах [116,117], выполненных более 40 лет назад при участии Уильяма и Маргарет Нейман. Совпадение некоторых характерных расстояний в ДНК с определёнными геометрическими параметрами решётки апатита также отмечалось другими авторами. Тем не менее, в работах Э. Костецкого усматривается нечто, отсутствующее у предшественников, – предположение, что некоторые длины связей в полинуклеотидах, возможно, *предопределены* какими-то геометрическими свойствами структуры апатита. Эта его догадка представляет несомненный интерес. Кроме того, Костецкий, вероятно, первым осознал, что разгадка тайны происхождения жизни кроется в возможности замещения ортофосфат-аниона в кристалле на фосфатные группы нуклеотидов, однако основная его идея о возникновении ДНК (а также и полипептидов) внутри апатита скорее может быть отнесена к жанру научной фантастики с физико-химическим уклоном. (В настоящей работе большое внимание уделено близости параметра c решётки апатита к длине фосфодиэфирной связи в В-ДНК, см. разделы 6.3.9 и 7.2, в работах Костецкого указаний на это совпадение не обнаруживается.

3.4 Выводы.

Работы по экспериментальному моделированию процессов, потенциально способных привести к возникновению жизни, выполненные в рамках бытующих представлений о мире РНК, не только не прояснили, как могла бы возникнуть жизнь, но и убедили экспертное сообщество в невозможности такого процесса. Биохимики сумели найти пути абиогенного синтеза нуклеотидов, однако попытки получить из них полинуклеотиды длиной хотя бы в тысячу нуклеотидов и осуществить их репликацию без помощи биокатализаторов наталкиваются на затруднения принципиального характера.

Усилия, истраченные в поисках условий, в которых процесс сборки полинуклеотидов из мононуклеотидов мог бы протекать спонтанно, не были напрасными. В глубоких и обширных исследованиях, выполненных с целью экспериментальной проверки теории мира РНК, были получены данные, позволяющие выявить критерии, которым процесс возникновения жизни должен удовлетворять. В следующей главе сделана попытка такие критерии сформулировать, а затем найти и процесс, им удовлетворяющий.

4. Стемпинг.

Гипотеза мира РНК, успешно объясняет многие особенности современных живых существ. Однако развитие этой теории наталкивается на затруднения принципиального характера. Первое затруднение, обсуждавшееся в главе 3, состоит в очевидной невозможности возникновения родоначальной молекулы РНК путём поликонденсации нуклеотидов. Второе, упоминавшееся в главе 2, состоит в том, что родоначальная молекула, запустившая процесс молекулярной эволюции, предполагается способной к саморепликации, а свойство это (если такая молекула вообще возможна) может быть приобретено лишь в ходе эволюции.

В настоящей главе предложен некий умозрительный процесс, позволяющий разрешить оба затруднения. Мы полагаем, что синтез родоначальной молекулы и её последующие циклы репликации осуществлялись в одном и том же процессе, причём сама реплицируемая молекула РНК не предполагается обладающей какой-либо специфической каталитической активностью.

Процесс, способный в одно и то же время привести к возникновению родоначальной молекулы и её последующей репликации, должен удовлетворять ряду ограничений, которые могут быть выявлены исходя из экспериментальных данных о взаимодействиях нуклеотидов, а также из общих соображений. Такие ограничения сформулированы в следующем разделе.

4.1. Постановка задачи.

... certum est, quia impossibile
(it is certain – because it is impossible)
Tertullian

Как следует из сказанного выше, для решения вопроса о происхождении жизни нужно, прежде всего, идентифицировать процесс, или несколько процессов сходной природы, способных в одно и то же время осуществить и синтез полинуклеотидов из мононуклеотидов, и репликацию одноцепочечной ДНК или РНК. Искомый процесс должен удовлетворять целому ряду жёстких ограничений. Ниже следует их список, занумерованный в целях удобства, для цитирования в последующих разделах.

(1) Разумно предположить, что стэкинг и водородные связи в уотсон-криковских парах – взаимодействия, участвующие в удержании двухцепочечных полинуклеотидов в

виде единого целого в современных организмах – должны быть как-то задействованы в процессе синтеза.

(2) Известный факт сходства геометрических параметров комплементарных пар нуклеотидов, состоящий в том, что длина пары С–G равна длине А–Т, и обе пары имеют одинаковую ширину (см. рис 5-37), должен возникать как следствие или как необходимое условие функционирования искомого процесса.

(3) Безуспешность попыток матричного синтеза ДНК и РНК, усугубляемая также наличием двух энантиоморфных форм нуклеотидов в исходной смеси, указывает на необходимость какого-то дополнительного механизма отбора, действующего параллельно гомологии водородных связей в уотсон-криковских парах нуклеотидов, вследствие которого уотсон-криковские пары получают преимущество над всеми остальными парами нуклеотидов. О необходимости такого дополнительного механизма отбора говорит и феномен *комбинаторного взрыва*. Искомый процесс должен обеспечить образование уотсон-криковских пар и только их из смеси, содержащей многие тысячи нуклеотидоподобных соединений, способных соединяться в многообразных сочленениях. Сходным образом, искомый процесс должен обеспечивать отбор молекул, при котором только нуклеотиды соединяются фосфодиэфирными связями, а тысячи других подобных соединений, способных к образованию аналогичной связи, отбраковываются.

(4) Успешная передача признаков по наследству невозможна без достаточно строгого соблюдения принципа комплементарности нуклеотидов во время репликации и транскрипции. Степень соответствия (*fidelity*) принципу комплементарности зависит, конечно, от механизма репликации. Например, рукотворный рибозим, показанный на Рис. 2-1, способный к репликации небольших олигомеров, обладает степенью соответствия, совершенно недостаточной для поддержания жизни в любых её формах. Очевидно, исходный механизм репликации и транскрипции не мог иметь системы исправления ошибок (*proofreading*) как у современных ДНК-полимераз. Следовательно, достаточно высокая степень соответствия принципу комплементарности должна быть присуща искомому процессу, возникать как одно из проявлений задействованного механизма.

(5) Искомый механизм должен обладать региоспецифичностью, гарантирующей соединение всех нуклеотидов фосфодиэфирными связями в сочленении 3'-5' и ни одного в 2'-5'. Более того, процесс должен создать предпосылки для соединения нуклеотидов в положении 3'→5', а не 5'→3', при том, что, согласно калориметрическим данным (см. далее, раздел 10.1.2) указанные сочленения энергетически неразличимы. В дополнение к сказанному, искомый механизм должен создавать предпосылки для объединения аномеров нуклеотидов в одну молекулу, так чтобы полинуклеотид состоял главным образом из α-аномеров или главным образом из β-аномеров (Рис 3-8), даже если оба аномера мононуклеотидов присутствуют в равных количествах в растворе.

(6) Процессы синтеза и репликации ДНК должны приводить к образованию двойных спиралей с *антиполярной* ориентацией комплементарных цепей.

(7) Искомый механизм должен обладать энантиоселективностью, создающей предпосылки к последующему возникновению гомохиральных РНК и ДНК современных организмов (посредством т.н. *chiral amplification* или как-то ещё). Энантиоселективность должна удовлетворять сразу двум критериям. С одной стороны, этот механизм должен эффективно препятствовать образованию гетерохиральных уотсон-криковских пар. С другой, должна иметь место энантиоселективность, в целом способствующая конденсации нуклеотидов одинаковой хиральности в одну макромолекулу.

(8) Искомый процесс синтеза полинуклеотидов должен протекать успешно даже при очень низких содержаниях нуклеотидов в исходной смеси, коль скоро высокие их концентрации крайне маловероятны.

(9) Во всех сколько-нибудь успешных попытках абиогенного синтеза олигонуклеотидов и их репликации обнаруживается весьма существенная зависимость выхода реакции от типа азотистого основания. Одним из неперменных условий

успешного зарождения жизни является отсутствие такой зависимости, как при синтезе, так и при репликации полинуклеотидов. Механизм синтеза исходной молекулы должен быть таким, чтобы все последовательности нуклеотидов имели примерно равные шансы на возникновение. Сходным образом, репликация и транскрипция должны осуществляться одинаково успешно вне зависимости от последовательности нуклеотидов.

(10) Фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах должны быть термодинамически стабильны по отношению к гидролизу во время синтеза. К этому выводу приводят и неудачи всех попыток синтеза полинуклеотидов из преактивированных мононуклеотидов, и слишком высокая (с геохимической точки зрения) скорость гидролиза фосфодиэфирных связей в них.

(11) Репликация и транскрипция, осуществляемые в искомом процессе, должны иметь некий встроенный изъян, который никак нельзя устранить путём многостадийного постепенного улучшения. В самом деле, в отсутствие подобных изъянов Природе не пришлось бы изменять механизмы транскрипции кардинальным образом, и они действовали бы и поныне.

4.2. Предварительное решение.

Ниже описан гипотетический абиогенный процесс, который мы будем называть *стемпингом*, осуществляющий синтез двухцепочечных полинуклеотидов из мононуклеотидов, удовлетворяющий перечисленным выше ограничениям. При незначительном изменении тот же процесс может быть использован для репликации и транскрипции или обратной транскрипции полинуклеотидов.

Мы полагаем, что в начальный момент раствор, содержащий мононуклеотиды, находится в контакте с гранью кристалла некоторого ортофосфата. Хорошо известно, что в стационарных условиях грани кристаллов (или их участки) обычно приобретают вид атомно-гладких плоскостей, возможно с т.н. ступенями роста. Составляющие кристалл атомы располагаются в этих плоскостях параллельными рядами. Мы предполагаем, что на поверхность грани выходят параллельные ряды тетраэдров PO_4 , возможно протонированных. Изолированные тетраэдры PO_4 , напомним, составляют характерный элемент кристаллической структуры ортофосфатов. Поверхность грани с выходящими на неё рядами тетраэдров PO_4 будет именоваться *основой*.

Сборка двухцепочечных полинуклеотидов из мононуклеотидов. Процесс осуществляется в несколько стадий. Сначала два комплементарных нуклеотида в растворе соединяются с образованием уотсон-криковской пары. Среднее время жизни такой пары в растворе невелико даже при низкой температуре, тем не менее, при любой температуре (в области существования жидкой воды) некоторая доля нуклеотидов в растворе объединена в уотсон-криковские пары, Рис. 4-1 (А).

Затем уотсон-криковская пара испытывает хемосорбцию, при которой фосфатные группы нуклеотидов помещаются в позиции тетраэдров PO_4 основы, вытесняя в раствор два фосфатных остатка основы. Мы постулируем, что адсорбция осуществляется *только* при размещении обеих фосфатных групп пары в соответствующих позициях тетраэдра PO_4 основы. Попадания одной из двух групп в позицию PO_4 недостаточно для адсорбции. Одиночные нуклеотиды (не входящие в состав пары), имея лишь одну фосфатную группу, также не могут быть адсорбированы. Сразу отметим, в силу делаемого предположения, пара нуклеотидов может быть притянута фосфатными группами к основе, только если расстояние P–P (между центрами фосфатных групп) в паре нуклеотидов близко к расстоянию между центрами тетраэдров PO_4 в соседних рядах основы, (Рис. 4-2). Таким образом, осуществимость данной стадии процесса предопределена двумя факторами:

гомологией структуры водородных связей в комплементарных нуклеотидах и сходством расстояний P–P в уотсон-криковской паре и в кристалле.

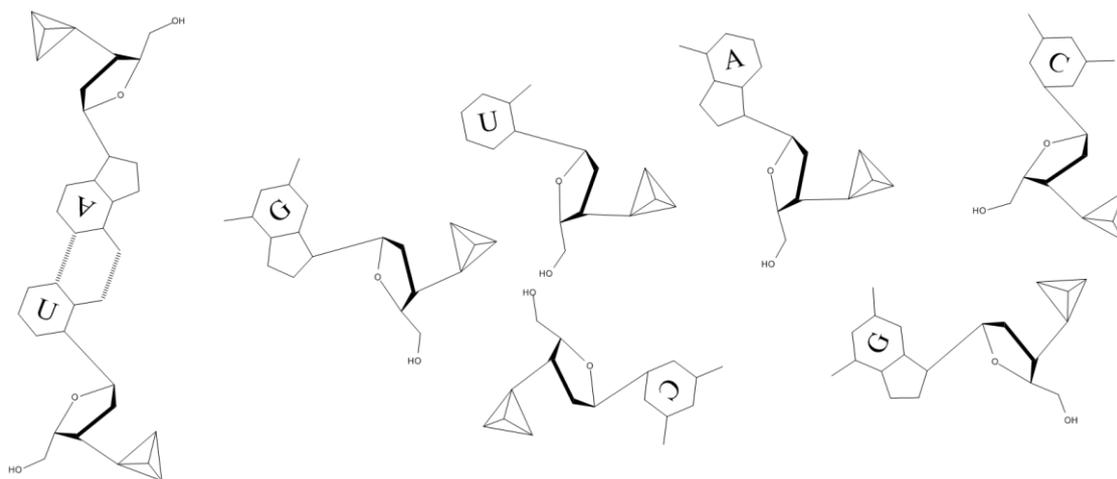
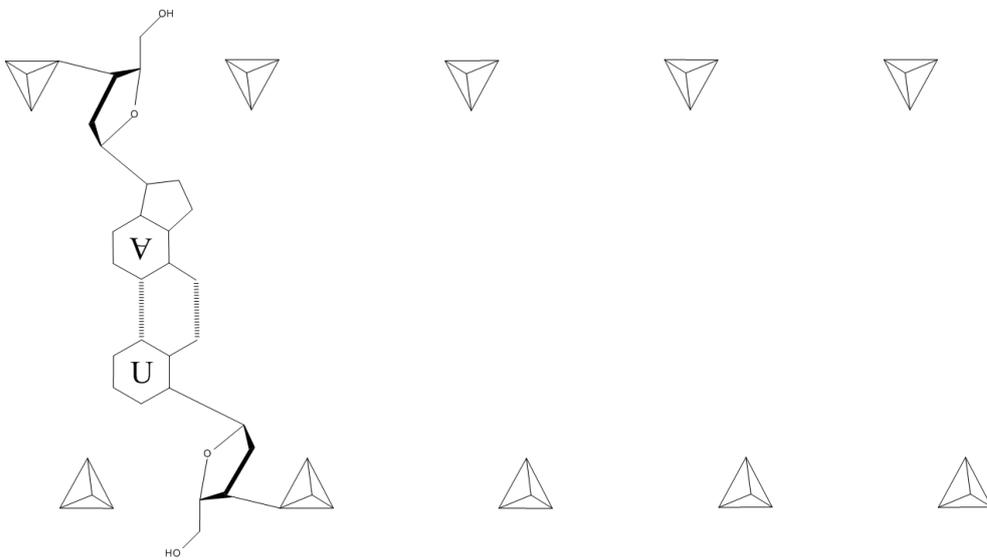
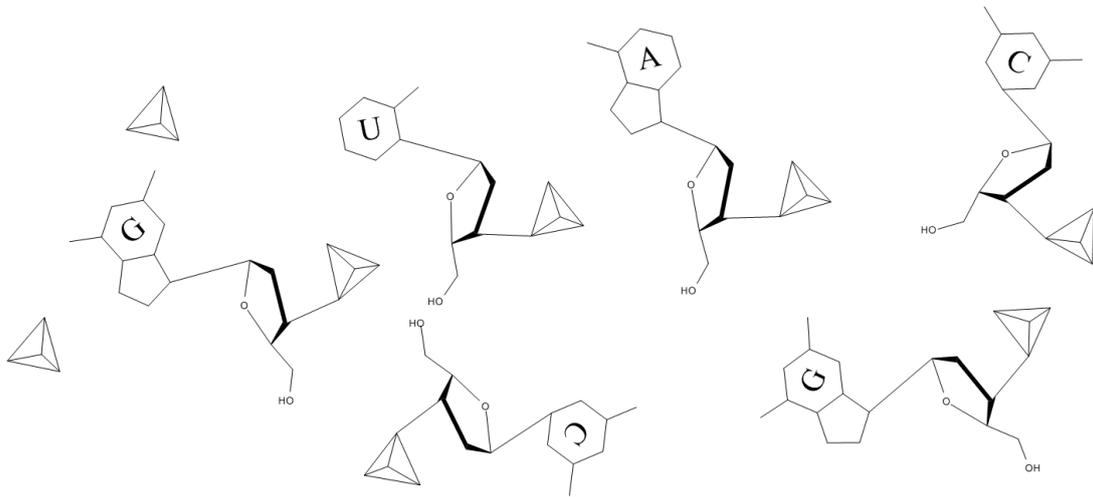
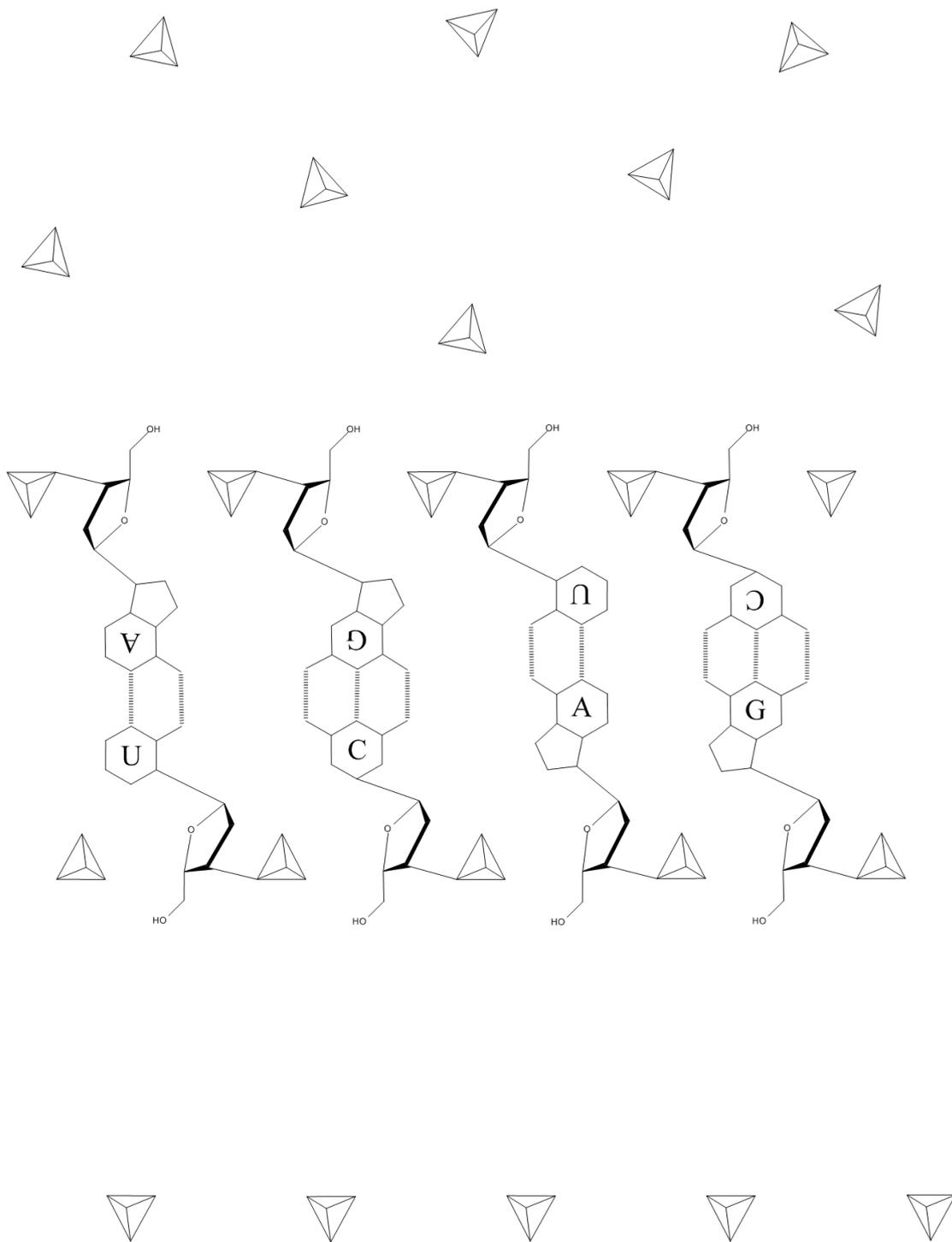


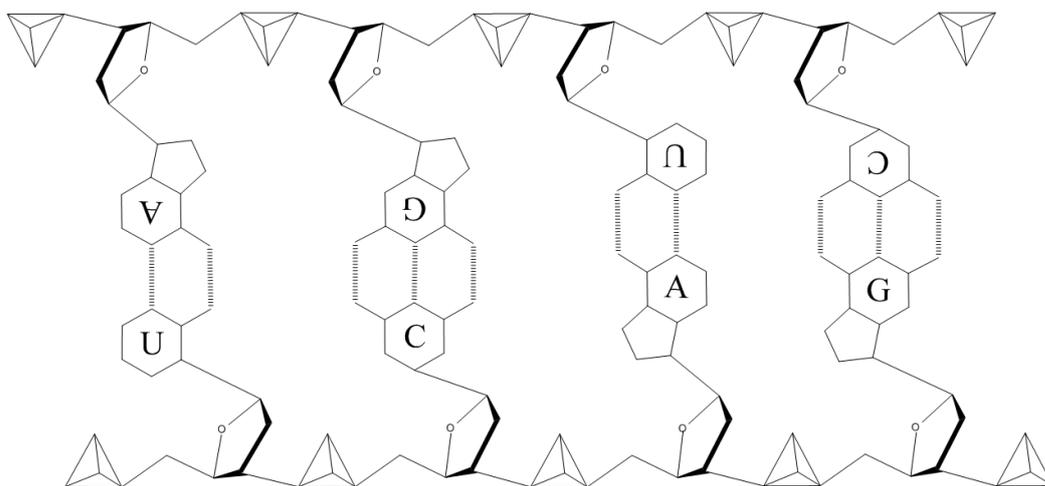
Рис 4-1 (А-Г). Синтез двухцепочечного полинуклеотида стемпингом грани кристалла ортофосфата. (А): Исходная конфигурация. Раствор нуклеотидов приведён в соприкосновение с гранью кристалла ортофосфата, содержащей ряды тетраэдрических групп PO_4 . Некоторые часть нуклеотидов в растворе спонтанно объединяется в уотсон-криковские пары.



(Б): Хемсорбция пары нуклеотидов гранью; фосфатные группы нуклеотидов вытесняют в раствор остатки ортофосфорной кислоты, занимая их позиции в структуре.



(В): Взаимное притяжение адсорбированных пар за счёт стэкинга придаёт хемосорбции характер кооперативного явления; пары объединяются в строчки, вытянутые вдоль двойных рядов из тетраэдров PO_4 на поверхности сорбирующей грани.



(Г): Соединение соседних нуклеотидов в строчке фосфодиэфирными связями.

Мы полагаем, что адсорбированные пары нуклеотидов способны взаимодействовать между собой посредством стэкинга, как то имеет место в двухцепочечных ДНК и РНК. Стэкинг приводит к взаимному притяжению ароматических колец оснований соседних пар нуклеотидов, вследствие чего уотсон-криковские пары обнаруживают тенденцию располагаться рядом, параллельно друг другу в процессе адсорбции. Вследствие стабилизирующего воздействия стэкинга, адсорбция пар нуклеотидов приобретает черты кооперативного явления, то есть сродство нуклеотида к поверхности в группе выше, чем у изолированных нуклеотидов. По мере увеличения числа адсорбированных пар нуклеотидов происходит постепенное замощение поверхности основы строчками из примыкающих пар комплементарных нуклеотидов. Чем больше пар нуклеотидов расположено на основе вплотную, один за другим, тем больше вероятность присоединения ещё одной пары к данной группе справа или слева. При этом в зависимости от геометрии основы, стэкинг может осуществляться двумя альтернативными способами: возможно непосредственное взаимодействие между соседствующими парами нуклеотидов, если расстояние между азотистыми основаниями оказалось близким к характерному расстоянию стэкинга, см. верхнее изображение на Рис 4-2. Пары нуклеотидов могут также взаимодействовать опосредованно, через интеркалирующий агент, если расстояние между соседними азотистыми основаниями вдвое больше характерного расстояния стэкинга, как показано на нижнем изображении Рис. 4-2. Последняя схема предполагает наличие интеркалирующего агента в растворе. В природе в этом качестве мог бы быть задействован аденин или другое ароматическое соединение растворимое в воде, а в лаборатории могут быть использованы специально разработанные интеркалирующие агенты.

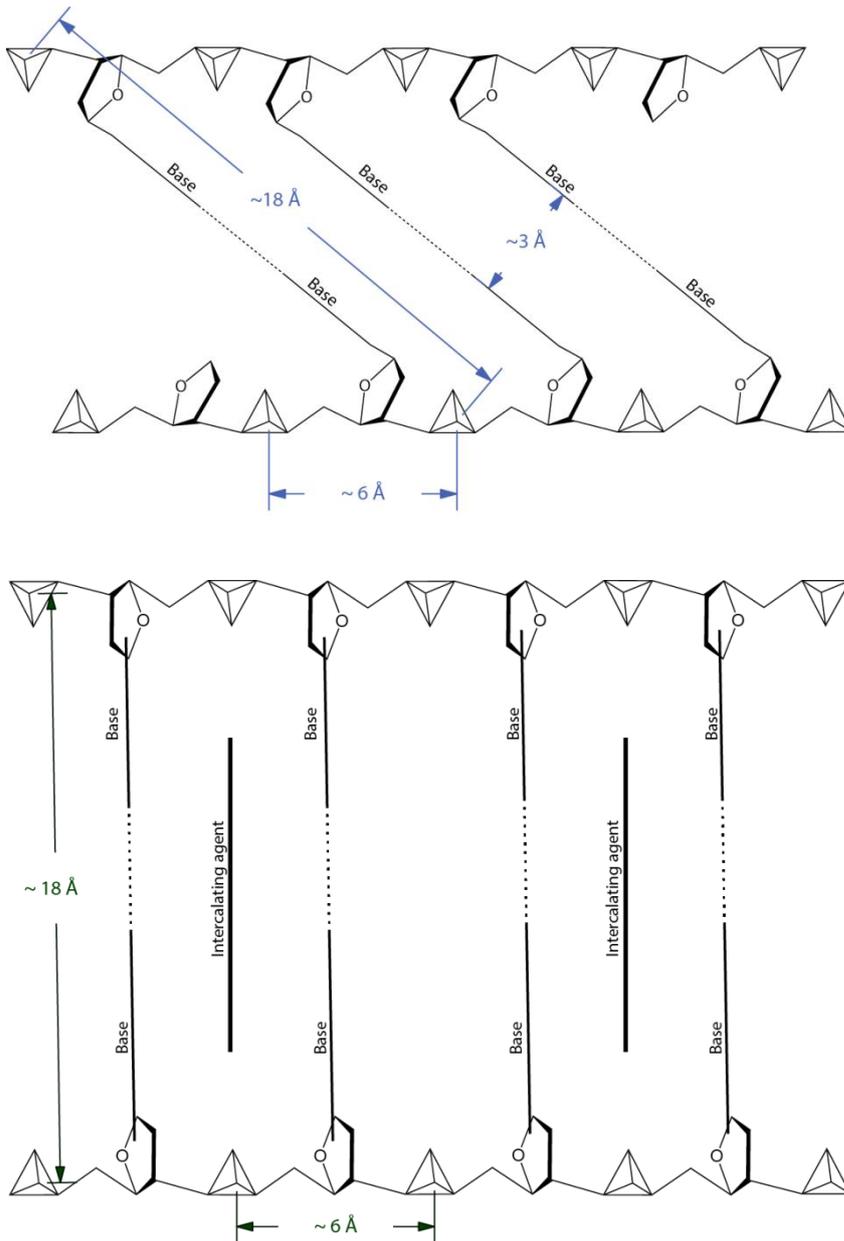


Рис 4-2. Два способа расположения конденсируемых нуклеотидов в основе и соответствующие им типы геометрического соответствия между межатомными расстояниями основы и длинами связей в полинуклеотидах. Вид сверху. Азотистые основания нуклеотидов и молекулы интеркалирующих агентов показаны полосками. *BBEPXV*: Непосредственное притяжение азотистых оснований соседних нуклеотидов в цепочке за счёт стэкинга. Уотсон-криковские пары ориентированы под острым углом к строчке (оси удлинения молекулы полинуклеотида). *ВНИЗУ*: Стэкинг осуществляется при посредничестве интеркалирующего агента. Уотсон-криковские пары ориентированы более или менее перпендикулярно строчке. Молекулы интеркалирующего агента занимают промежутки между нуклеотидами через одного, в соответствии с т.н. *neighbor-excluding rule*.

Наконец, мы полагаем, что на заключительной стадии процесса соседние нуклеотиды в одном ряду основы соединяются фосфодиэфирными связями. Разумеется, это предполагает равенство расстояния Р–Р в ряду тетраэдров PO_4 основе длине фосфодиэфирной связи (в соответствующих условиях), Рис 4-2.

В результате описанного выше процесса, который мы будем называть *стемпингом*, образуется комплекс, состоящий из двухцепочечного нуклеотида, развернутого «лесенкой», и кристаллической основы. Впоследствии, при подходящих изменениях в

составе раствора, полинуклеотид может быть удалён с основы посредством десорбции (элюирования) или путём растворения кристалла. Оказавшись в растворе, молекула самопроизвольно сворачивается в спираль.

Копирование полинуклеотидов стемпингом. Предположим, грань кристалла, которой надлежит стать основой, приведена в контакт с раствором, содержащим одноцепочечные полинуклеотиды. Предположим для определённости, что это молекулы РНК, образовавшиеся, например, путём денатурации ранее синтезированных двухцепочечных молекул. Мы полагаем, что фосфатные группы РНК встраиваются в позиции тетраэдров PO_4 основы, вытесняя в раствор находящиеся там остатки ортофосфорной кислоты, Рис. 4-3(А). Разумеется, для этого необходимо, чтобы длина фосфодиэфирной связи была целым кратным расстояния P-P в соответствующем ряду тетраэдров PO_4 основы.

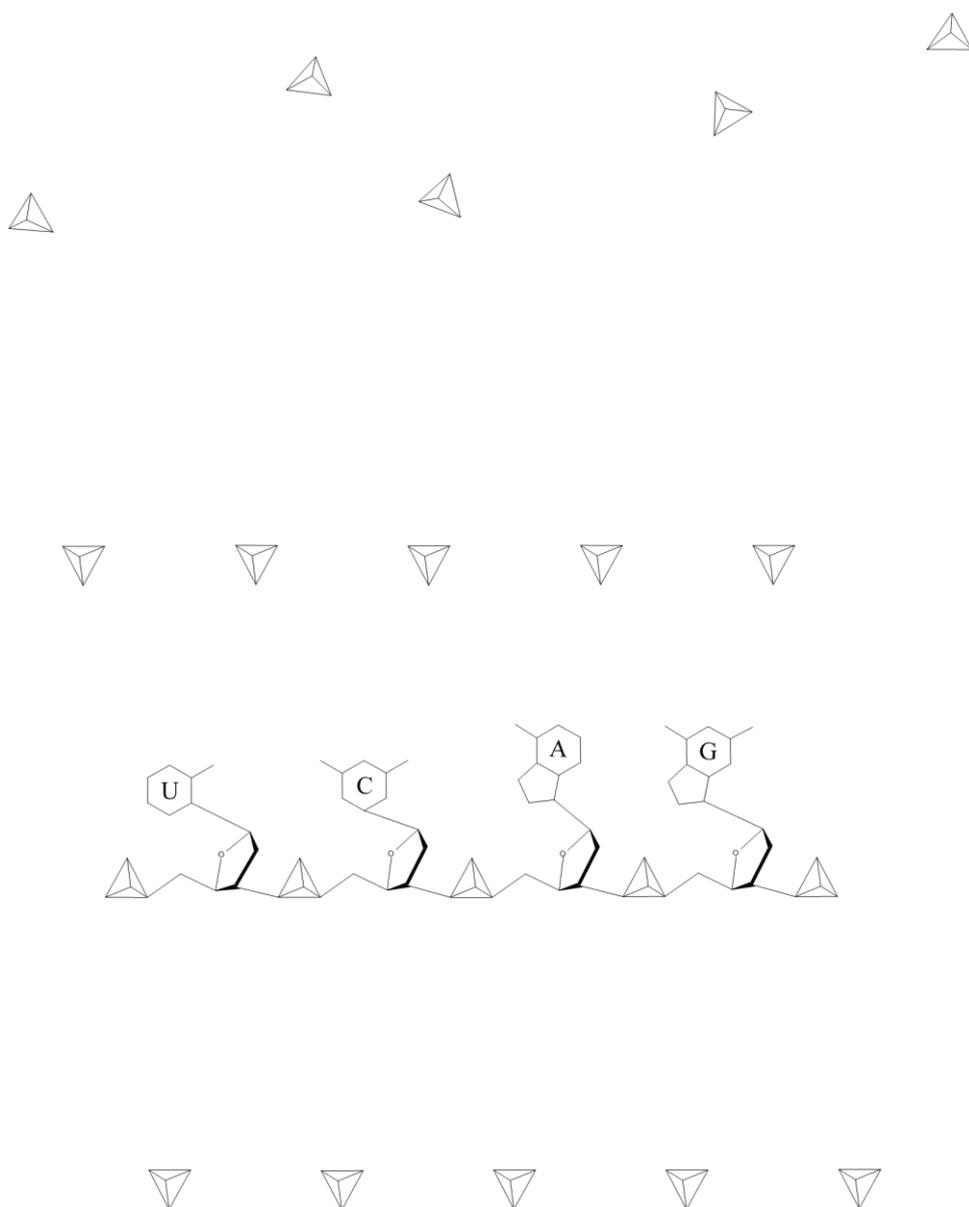
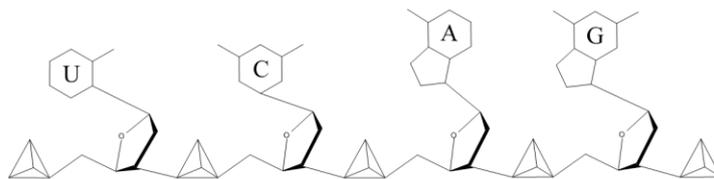
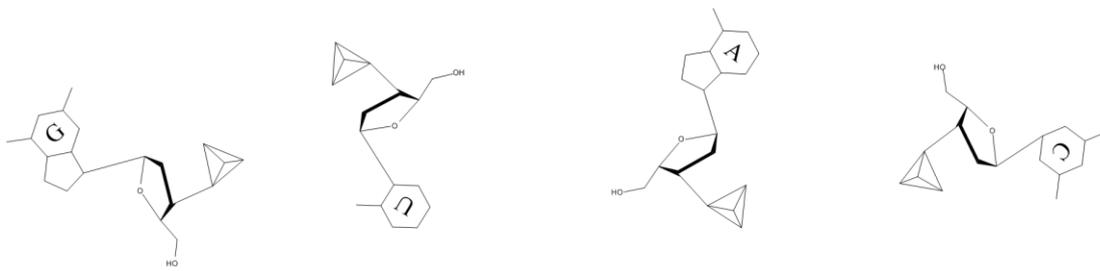
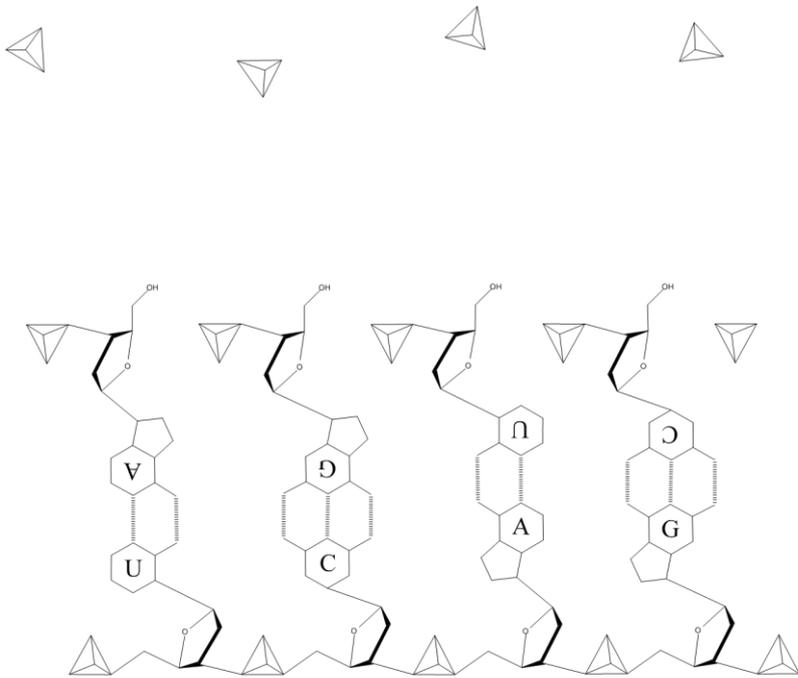


Рис 4-3(А-Г). Репликация полинуклеотида стемпингом ортофосфатной основы.

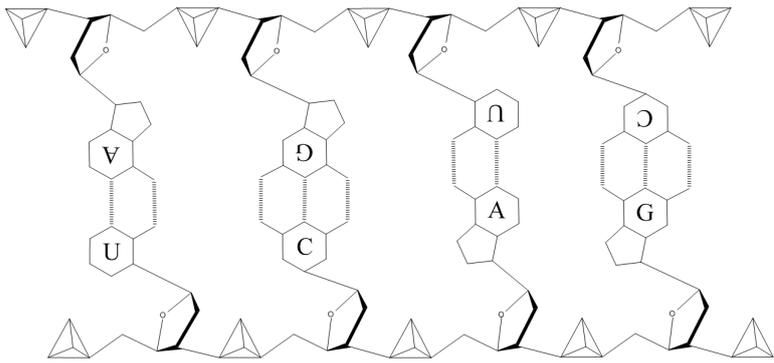
А: Адсорбция одноцепочечного полинуклеотида с образованием одинарной строчки и вытеснением в раствор эквивалентного количества остатков ортофосфорной кислоты.



Б: Кристалл приведён в контакт с раствором, содержащим мононуклеотиды.



В: Мононуклеотиды испытывают хемосорбцию, образуя уотсон-криковские пары с азотистыми основаниями ранее адсорбированного одноцепочечного полинуклеотида, вытесняя в раствор эквивалентное количество ортофосфата.



Г: Соединение адсорбированных мононуклеотидов фосфодиэфирными связями.

Затем образовавшийся комплекс, состоящий из одноцепочечной РНК, укоренённой в основе, помещается в раствор, содержащий мононуклеотиды, Рис 4-3 (Б). Условия опыта меняются таким образом, что теперь фосфатные группы мононуклеотидов стремятся разместиться в позициях PO_4 основы, однако устойчивый комплекс образуют лишь те нуклеотиды, которые поместили свои фосфатные группы точно напротив комплементарных им нуклеотидов цепочки РНК и образовали с ними водородные связи, Рис. 4-3 (В). Азотистые основания нуклеотидов испытывают взаимное притяжение в направлении оси удлинения РНК за счёт стэкинга. При этом, как и выше, в зависимости от геометрических особенностей основы, возможен либо непосредственный стэкинг примыкающих нуклеотидов, либо они взаимодействуют при посредничестве интеркалирующего агента, размещённого точно посередине между соседними парами нуклеотидов, Рис 4-2. В обоих случаях стэкинг придаёт процессу хемосорбции мононуклеотидов кооперативный характер. Иначе говоря, мононуклеотиды, поместившие свои фосфатные группы в соседние позиции тетраэдров PO_4 , прочнее связываются с основой и удерживаются в этих позициях в течение более длительного времени.

На завершающей стадии процесса происходит соединение адсорбированных мононуклеотидов фосфодиэфирными связями подобно тому, как это имело место при синтезе двухцепочечных полинуклеотидов, описанном выше, Рис 4-3 (Г). В результате, после отделения от основы и денатурации, получается РНК-реплика исходной РНК-матрицы. Ясно, что при двукратном повторении этого процесса образуется молекула РНК, аналогичная исходной. Мы полагаем, что именно так осуществлялась репликация родоначальной РНК в природе.

Помимо репликации РНК, описываемый процесс может быть использован для репликации ДНК. Для этого нужно одноцепочечную ДНК расправить на основе, затем привести поверхность основы в контакт с раствором, содержащим мономеры дезоксирибонуклеотидов. Если же в качестве матрицы использована одноцепочечная РНК, а раствор содержит дезоксирибонуклеотиды, то получится химера из цепочки РНК и цепочки ДНК, т.е. будет иметь место обратная транскрипция (синтез ДНК по РНК-матрице). Наконец, для осуществления транскрипции достаточно расправить одноцепочечную ДНК на основе и поместить её в раствор рибонуклеотидов.

В последующем изложении ряды из нуклеотидов или уотсон-криковских пар, адсорбированных основой, т.е. поместивших свои фосфатные группы в позиции тетраэдров PO_4 основы, будут именоваться *строчками* (соответственно, *одинарными* или *двойными*).

4.3. Предварительное обсуждение.

Поскольку описанный в предшествующем разделе процесс стемпинга является чисто умозрительным, в отсутствие каких-либо данных, у нас нет пока возможности судить о его осуществимости. Однако даже из общего описания ясно, что процесс удовлетворяет многим ограничениям из нашего списка в разделе 4.1.

Прежде всего, обращает на себя внимание особенность стемпинга, которую можно назвать *геометрической селекцией*. Упорядоченное расположение тетраэдров PO_4 в основе приводит к аналогичному порядку в расположении занимающих их фосфатных групп нуклеотидов. Вследствие этого длины образующихся при стемпинге связей должны быть согласованы с двумя характерными расстояниями P–P в структуре основы (вдоль строчки и поперёк). Из этого непосредственно следует удовлетворение нашего ограничения (2): обе уотсон-криковские пары имеют одинаковую ширину и одинаковую длину, поскольку при указанном механизме адсорбции длина и ширина пары задана геометрическими свойствами основы. Более того, геометрическая селекция – это и есть дополнительный критерий отбора, регулирующий, наряду с гомологией водородных

связей в парах, образование полинуклеотидов, оговоренный в пункте (3). В самом деле, успешная хемосорбция (при синтезе двуцепочечных полинуклеотидов) осуществляется только при наличии пары фосфатных групп, расположенных на расстоянии, равном соответствующему межатомному расстоянию в основе. Для азотистых оснований нуклеотидов известно более 20 различных гомологичных пар. К сожалению, мне не известны характерные расстояния Р–Р для соответствующих пар нуклеотидов, но, как видно из Рис. 4-4 (см. также Рис. 5-37), пары характеризуются различным взаимным расположением нуклеотидов, и поэтому расстояния Р–Р в них, вероятно, различны. Тем самым, только уотсон-криковские пары нуклеотидов войдут в состав строчки, а пары всех остальных типов будут отторгнуты.

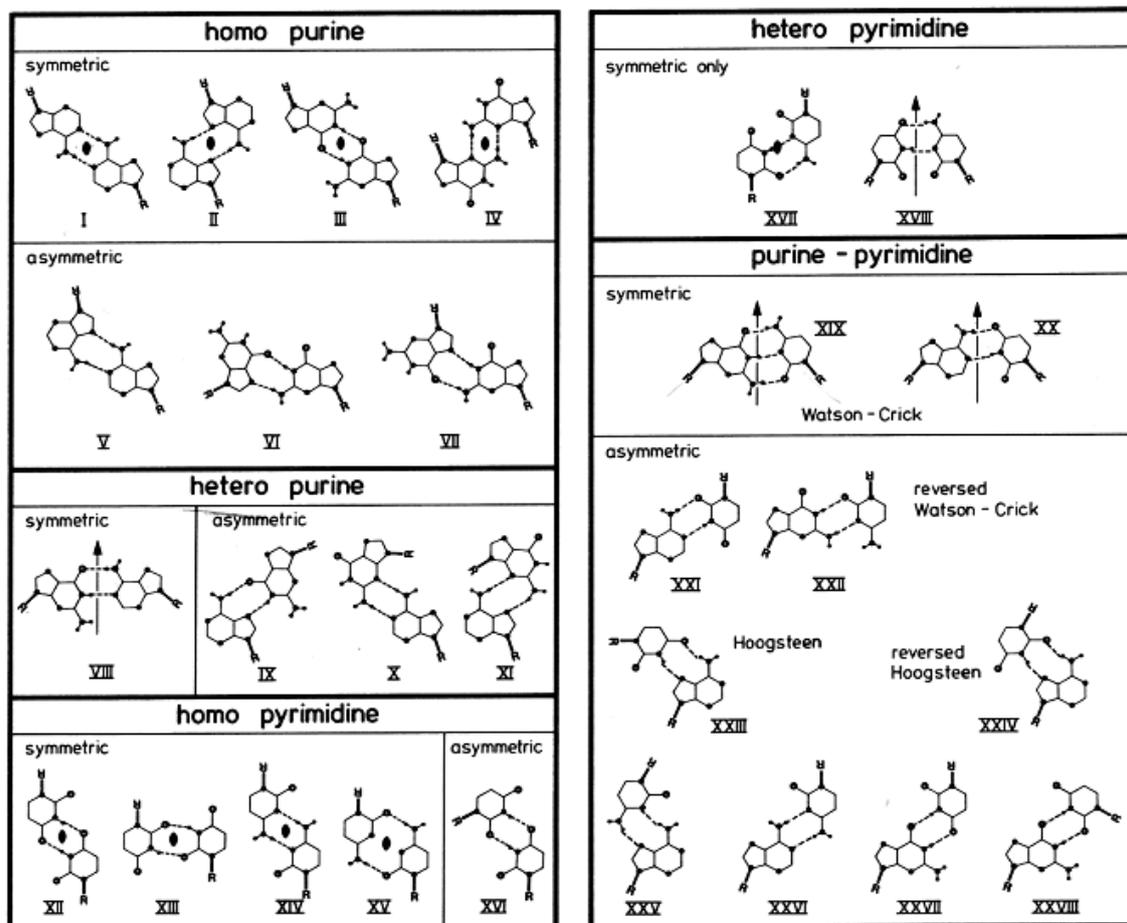


Рис 4-4. Известные сочленения двух азотистых оснований нуклеотидов двумя или тремя водородными связями. Из лекции [87].

Тот же принцип геометрической селекции гарантирует высокую степень соответствия принципу комплементарности (*fidelity*) при всех процессах стемпинга, включая репликацию и транскрипцию, оговоренную в пункте (4): постоянство длины пары нуклеотидов предполагает, что одно из двух соединяющихся оснований будет пуриновым, а другое – пиримидиновым. Это ограничение, дополняемое (менее строгим) требованием гомологии водородных связей в парах оснований, и обеспечило воспроизведение наследственной информации в процессе добиологической эволюции.

Комбинирование принципа геометрической селекции с требованием гомологии водородных связей в парах не только обеспечивает соблюдение принципа комплементарности, но и позволяет избежать комбинаторного взрыва. Предположим, в растворе присутствуют многообразные нуклеотидоподобные соединения, способные

образовывать гомологичные пары. Те из них, что не имеют фосфатных групп, не смогут быть адсорбированы и потому будут отторгаются. Если же фосфатные группы присутствуют, адсорбироваться смогут лишь те, расстояния P–P в которых равны соответствующему расстоянию для уотсон-криковских пар. Изменения в структуре азотистых оснований, замены рибозы на другой сахар или фосфорилирование сахара в отличной позиции – все с высокой вероятностью приведут к изменению в расстоянии P–P, в результате которого адсорбция станет невозможной. Далее, если среди миллионов нуклеотидоподобных соединений некоторые смогут объединиться в пары с подходящей величиной расстояния P–P, позволяющей им адсорбироваться основой, они, скорее всего, не смогут образовать фосфодиэфирных связей. Одни – в силу структурных особенностей молекулы, не оставляющих возможностей для такой связи, другие – потому что соответствующая фосфодиэфирная связь не будет иметь подходящей длины. Замена рибозы на тетрозу или гексозу, например, приведёт, соответственно, к укорочению или удлинению фосфодиэфирных связей. В итоге синтезируемый полимер оказывается состоящим только из нуклеотидов, объединённых в уотсон-криковские пары и никакие другие.

Из принципа геометрической селекции вытекает также оговоренное в пункте (5) наличие региоспецифичности, способствующей соединению нуклеотидов в сочленении 3'-5' (а не 2'-5'). Точнее, из этого принципа следует единообразие сочленения рибоз в цепочке фосфодиэфирными связями, так как замена, скажем, сочленения 3'-5' на 2'-5' приведёт к изменению длины фосфодиэфирной связи.

Далее, из общего описания стемпинга становится ясным, каким образом при синтезе первоначальной молекулы полинуклеотида был преодолён ещё один фактор комбинаторного взрыва – сосуществование α - и β -аномеров в исходной смеси. Как указывалось выше, в разделе 3.2, в лабораторных условиях могут быть синтезированы двухцепочечные полинуклеотиды, в которых β -аномеры в стандартной ориентации 3'→5' чередуются с α -аномерами в ориентации 5'→3'. В таких полинуклеотидах сохраняется гомология водородных связей, как в стандартных уотсон-криковских β - β парах, так что в одной молекуле двухцепочечного полинуклеотида сосуществуют β - β , α - α пары в антипараллельной ориентации и α - β пары в параллельной ориентации. Для растворённого в воде полинуклеотида чередование пар β - β , α - α в антипараллельной ориентации с парами α - β в параллельной ориентации, неизбежно сопровождающееся возникновением фосфодиэфирных связей в конфигурации 3'-3' и 5'-5', не создаёт каких-либо затруднений. Образование двухцепочечного полинуклеотида путём спаривания таких цепочек в растворе тоже не вызывает затруднений, поскольку термодинамические свойства пар α - α , β - β и α - β близки или совпадают. Однако при синтезе полинуклеотидов стемпингом основы ситуация меняется.

Как видно из Рис 4-5, следование α -аномера за β -аномером в одноцепочечном полинуклеотиде укоренённом в основу, обязательно сопровождаемое инверсией ориентации (в данном случае с 3'→5' на 5'→3'), приводит к тому, что кислороды O_4' соседствующих рибоз оказываются на более близком расстоянии. В растворе расстояние между этими атомами легко может быть увеличено за счёт изменения конформации фуранозного кольца без изменения длин связей. Однако кольцо рибозы, притянутое к поверхности двумя фосфатными группами, такой возможности не имеет. Способность фуранозного кольца изменить *sugar pucker* ограничивается стерически. Поэтому нуклеотиды в одной цепочке преимущественно должны ориентироваться в одном направлении для увеличения расстояния между их кислородами O_4' и уменьшения происходящей от этого энергии электростатического отталкивания. (О необходимости удерживать на максимальном удалении атомы кислорода O_4' соседних нуклеотидов цепочки свидетельствуют данные о структуре двухцепочечных полинуклеотидов с гетерохиральными уотсон-криковскими парами, Рис 3-7.)

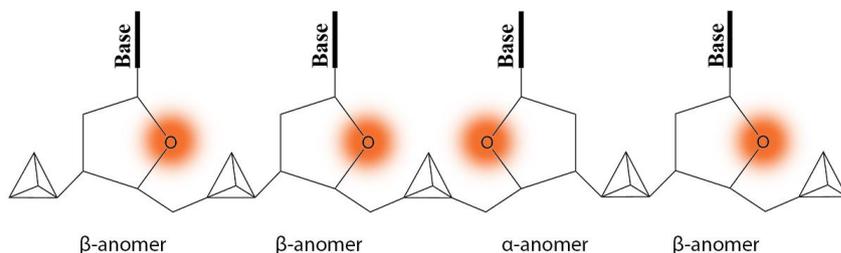


Рис 4-5. При следовании α -аномера нуклеотида за β -аномером в одноцепочечном полинуклеотиде, образующем строчку основы, инверсия ориентации (в данном случае с $3' \rightarrow 5'$ на $5' \rightarrow 3'$), приводит к тому, что кислороды O_4' соседствующих рибоз оказываются на более близком расстоянии, чем при следовании одинаковых аномеров (предполагающем отсутствие инверсии).

Вывод о том, что нуклеотиды одной цепочки, составляющей часть синтезированного стемпингом двухцепочечного полинуклеотида, должны преимущественно состоять из одного аномера и находиться в одинаковой ориентации, оставляет две возможности: две цепочки должны (преимущественно) находиться в антипараллельной ориентации, и в этом случае обе цепочки состоят из аномеров одного типа (β - β или α - α), или же цепочки преимущественно состоят из пар α - β и имеют параллельную ориентацию. Одним из факторов, способных повлиять на взаимную ориентацию синтезируемых цепочек и тем самым определить, будет ли синтезируемый двухцепочечный полинуклеотид состоять из аномеров одного или двух типов, является локальная симметрия основы. Если локальная симметрия грани кристалла, выступающей в качестве основы, такова, что два тетраэдра PO_4 в решётке, соответствующие фосфатным группам одной уотсон-криковской пары, связаны центром инверсии или действием поворотной оси второго порядка, то возникающая конфигурация способствует антипараллельной ориентации цепочек синтезируемого полинуклеотида (β - β или α - α). Когда группа симметрии содержит плоскость симметрии, проходящую посередине строчек так, что один ряд тетраэдров PO_4 оказывается зеркальным отражением другого, то более вероятно возникновение параллельных цепочек (α - β). Если же тетраэдры связаны другими элементами симметрии решётки, трансляцией например, ситуация оказывается неопределённой.

Из общего описания процесса стемпинга видно также, что он должен обладать аномальной энантиоселективностью, оговоренной в пункте (7). Ситуация, в которой два следующих друг за другом нуклеотида одной цепочки имеют одинаковую хиральность, энергетически предпочтительнее ситуации, когда их хиральность различна. В самом деле, фуранозные кольца нуклеотидов не имеют плоскостей симметрии, в частности они не являются симметричными по отношению к плоскости кольца. Взаимодействие кольца с кристаллом-сорбентом зависит от того, какой стороной – правой или левой – кольцо примыкает к его поверхности.

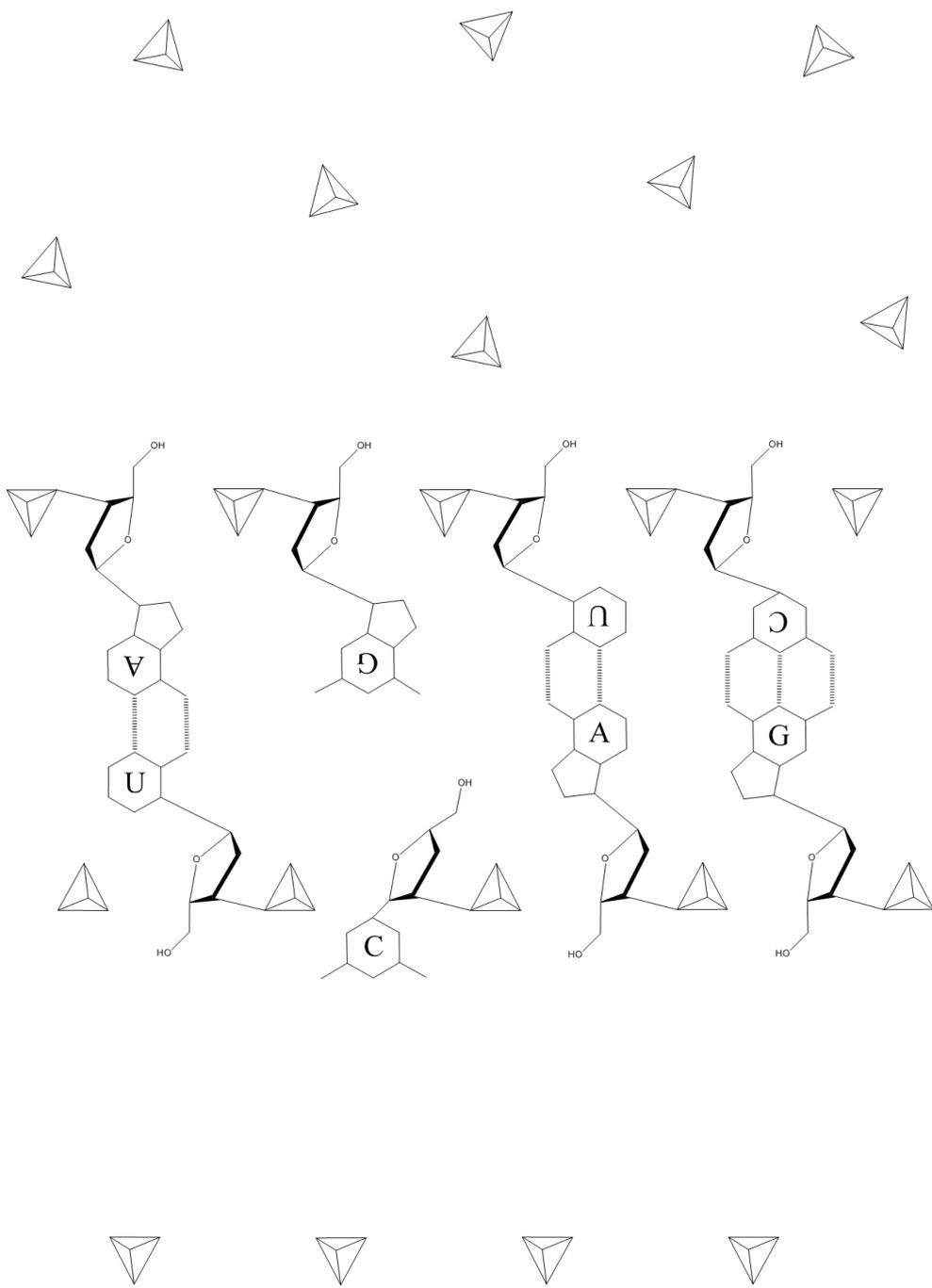


Рис 4-6. Гипотетический процесс адсорбции нуклеотидов основой, в котором фуранозное кольцо примыкает к поверхности лишь одной стороной. Все изображенные нуклеотиды за исключением одного (L-цитозина) являются D-энантиомерами.

На Рис. 4-6 изображён (умозрительный) процесс адсорбции нуклеотидов основой, в котором фуранозное кольцо примыкает лишь одной стороной к поверхности кристалла. Как можно видеть, в этих условиях из двух примыкающих нуклеотидов различной хиральности в цепочке лишь один имеет шансы образовать уотсон-криковскую пару. В реальности фуранозные кольца рибоз, наверное, могут примыкать обеими сторонами к кристаллу, но взаимодействие их с кристаллом при этом будет отличным, одна из двух конфигураций будет энергетически более выгодной, и этим создаются предпосылки для энантиселективности процесса, стремящейся к гомохиральности нуклеотидов одной цепочки.

Далее, преимущественная гомохиральность каждой из двух цепочек означает, что обе цепочки должны состоять преимущественно из одного и того же энантиомера. Это следует из данных о стабильности двухцепочечных гетерохиральных полинуклеотидов, изложенных выше, в разделе 3.2 при обсуждении проблемы хиральности. Там было указано, что при большом количестве гетерохиральных уотсон-криковских пар, содержащих нуклеотиды всех четырёх типов (А, Т, G и С), двухцепочечный полинуклеотид распадается на две цепочки, то есть гомология водородных связей в парах нарушается. Поэтому, если одна цепочка будет состоять преимущественно из нуклеотидов одной хиральности, то комплементарная ей цепочка, образуемая при стемпинге, должна иметь преимущественно ту же хиральность. Более того, выше было указано, что вставка отдельных нуклеотидов отличной хиральности в гомохиральный двухцепочечный полинуклеотид (с образованием гетерохиральных уотсон-криковских пар) может быть осуществлена, если число таких пар невелико, посредством образования т.н. *low anti* конформации гликозидной связи, Рис 3-6, 3-7). Подобная конформация достигается за счёт образования необычного *sugar pucker* фуранозного кольца нуклеотида. Однако такой *sugar pucker* (как у L-G4 на Рис. 3-7) не может возникнуть, если фуранозное кольцо рибозы адсорбировано поверхностью основы. Тем самым возникновение гетерохиральных уотсон-криковских пар при стемпинге маловероятно. Из сказанного следует, что двухцепочечный полинуклеотид, образуемый при стемпинге, будет преимущественно состоять из нуклеотидов одной хиральности.

Из описания процесса стемпинга ясно также, что он позволяет успешно синтезировать полинуклеотиды, даже если исходный раствор содержит мономеры нуклеотидов в ничтожных концентрациях, как оговорено в пункте (8). В самом деле, процесс осуществляется на поверхности одной из граней (макроскопического) кристалла. Для заполнения даже всего монослоя на этой поверхности большого количества нуклеотидов не потребуется учитывая, что кристаллы ортофосфатов, за редчайшими исключениями, крупных скоплений в природе не образуют).

Далее, в пункте (9) нами оговорено, что успех или неуспех синтеза полинуклеотидов из мононуклеотидов не должен зависеть от типа нуклеотидов. Вопрос о наличии такого свойства у процесса стемпинга из общего описания решён, конечно, быть не может. Однако именно такое развитие событий представляется наиболее правдоподобным, поскольку части нуклеотидов, непосредственно контактирующие с основой – фосфатные группы и рибозы – идентичны во всех четырёх нуклеотидах.

В пункте (10) нашего списка оговаривается, что в течение процесса фосфодиэфирная связь должна быть термодинамически стабильной по отношению к гидролизу. Разумеется, из описания самого по себе никак нельзя сделать вывод о справедливости или ошибочности этого допущения. Однако из общих соображений само это допущение может быть уточнено. Оказывается, изложенная картина явления, названного нами стемпингом, предполагает, что фосфодиэфирная связь должна быть стабильна, но не слишком. Свободная энергия гидролиза этой связи в условиях спонтанного образования родоначальной молекулы в природе должна быть близка к нулю.

В самом деле, процесс стемпинга представляет собой проявление четырёх типов взаимодействий: ионные силы, притягивающие фосфатные группы нуклеотидов к катионам основы, водородные связи и стэкинг азотистых оснований нуклеотидов и, наконец, ковалентные фосфодиэфирные связи. Взаимодействия эти имеют разную природу, но для успешного синтеза полинуклеотида в природе необходимо, чтобы все эти взаимодействия были слабыми. Причём так, чтобы комплекс, состоящий из двухцепочечного полинуклеотида и основы, обретал термодинамическую стабильность *только* если все четыре взаимодействия задействованы надлежащим образом. Свободной энергии, выделяемой при образовании любых трёх из указанных типов связей, должно быть недостаточно для стабилизации. В этих и только этих условиях отклонения от регулярности строчки, такие как образование пары нуклеотидов, не являющейся уотсон-

криковской, присоединение нуклеотида неподходящей хиральности или вставка в строчку соединения, не являющегося нуклеотидом, приведёт к локальной дестабилизации комплекса, его диссоциации и, в конечном итоге, адсорбции подходящего нуклеотида с устранением дефекта.

Из изложенного в предыдущем параграфе выводятся два следствия. Первое заключается в том, что величина свободной энергии гидролиза фосфодиэфирной связи должна быть близка к нулю. Данный факт может быть проверен экспериментально. Близость этой величины к нулю была бы аргументом в пользу развиваемых положений. (Вопросы термодинамики полинуклеотидов детально обсуждаются в главе 10. Забегая вперёд, свободная энергия гидролиза фосфодиэфирной связи, согласно новейшим замерам, действительно очень близка к нулю.)

Во-вторых, близость свободной энергии процесса стемпинга к нулю означает, что спонтанное возникновение двухцепочечной РНК в этом процессе, состоящем из циклов адсорбции и диссоциации, возможно, только если система длительное время пребывает в состоянии, близком к состоянию термодинамического равновесия. Такие процессы, как известно, протекают с очень низкой скоростью. Образование первых молекул РНК, запустивших процесс добиологической эволюции, могло длиться сотни лет или даже десятки тысяч лет. А потому всеобъемлющая имитация этого процесса в лабораторных условиях не представляется возможной. Речь может идти лишь о синтезе полинуклеотидов из растворов мононуклеотидов (а не из смесей, содержащих тысячи сходных молекул), и для завершения процесса за приемлемое время необходимо сделать фосфодиэфирную связь термодинамически более стабильной. Иначе говоря, практическое воплощение стемпинга в лабораторных условиях возможно только, если будет обнаружен параметр равновесия, меняя который мы могли бы регулировать степень термодинамической стабильности фосфодиэфирной связи полинуклеотидов по своему усмотрению. (Параметр равновесия, позволяющий регулировать степень термодинамической стабилизации фосфодиэфирной связи полинуклеотидов, предъявлен в разделе 10.5.5.)

Последнее требование из списка в разделе 4.1 (помещённое под номером 11), заключается в указании неких недостатков, присущих процессу репликации и транскрипции, действовавшему до возникновения полимераз, в отсутствие которого в полимеразах и не возникло бы необходимости. Таковых изъянов у стемпинга обнаруживается не меньше двух. Во-первых, передача наследуемой информации стемпингом предполагает физический контакт организма с гранью фосфатного кристалла. Тем самым, жизнь, в её архаичной форме, могла существовать лишь на поверхности кристаллов некоторого вполне определённого минерала.

По мере совершенствования мембраны и, в особенности, после возникновения молекулярных насосов, у древних организмов должна была выработаться способность успешно функционировать, концентрируя фосфаты подобно современным организмам, при фоновых концентрациях фосфора в среде. Это открыло бы для них безбрежные просторы океана с их неисчерпаемыми ресурсами, если бы только древние организмы были в состоянии осуществлять репликацию и транскрипцию вне поверхности фосфатного кристалла.

В принципе, они могли бы обрести свободу научившись выращивать кристаллы необходимого фосфата внутри себя самих. Однако кристаллы, в отличие от макромолекул, нельзя сматывать в бухты. Молекула ДНК бактерии *Escherichia coli*, например, содержит 4.64×10^6 пар нуклеотидов. Для репликации такой молекулы, полагая 6 \AA на нуклеотид, понадобился бы кристалл длиной 2.8 mm . Затруднения подвижного микроорганизма, несущего в себе кристалл таких размеров, вполне очевидны. Тем самым, первый изъян репликации по механизму стемпинга заключается в его громоздкости.

Второй изъян репликации, осуществляемой стемпингом, проистекает из ещё одного свойства присущего кристаллам – дефектам. Дефекты, такие как дислокации, например,

всегда присутствуют в кристаллах, и это должно было приводить к перерывам в копируемых генах или к ошибкам копирования.

Заканчивая предварительное обсуждение процессов синтеза полинуклеотидов стемпингом, отметим одну их особенность, касающуюся степени единообразия нуклеотидов, вошедших в одну конкретную молекулу синтезированного двуцепочечного полинуклеотида. Из описания процесса ясно, что процесс стемпинга должен приводить к превалированию одной хиральности и одного типа аномеров в каждой конкретной молекуле, однако это превалирование не может быть тотальным. Очевидно, такой процесс не мог, да и не должен был приводить к стопроцентному превалированию β -D-нуклеотидов, наблюдаемому в современных организмах. Ещё один аспект стемпинга состоит в том, что превалирование какого-то одного типа аномера и энантиомера в каждой отдельной молекуле синтезируемого двухцепочечного полинуклеотида является следствием стерических ограничений, присущих процессу стемпинга, но не служит условием успешности его протекания.

4.4 Попытки конкретизации.

Коль скоро процессы стемпинга, пока чисто умозрительные, действительно обнаруживают уникальные особенности, необходимо присущие процессу, в котором могла бы возникнуть жизнь (по крайней мере, некоторые из этих особенностей), уместным представляется и вопрос о возможности практического воплощения этих процессов. В качестве первого шага в данном направлении, в настоящем разделе сделана попытка идентифицировать минерал, грань кристалла которого могла бы послужить основой при возникновении жизни на земле, используя минералого-геохимические и кристаллохимические критерии.

Геохимические критерии. Минерал, способный выполнить роль основы в процессе стемпинга, не мог быть редким. После возникновения жизни, кристаллы этого же минерала использовались древнейшими организмами для транскрипции и репликации на протяжении миллионов лет, пока не были созданы полимеразы. Значит, кристаллы этого минерала можно было обнаружить на поверхности земли или на дне океана в достаточных количествах.

Существует лишь один фосфат, в полной мере удовлетворяющий критерию распространённости – апатит, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{Cl}, \text{F}, \text{OH})$, являющийся типичным акцессорным минералом большинства магматических и метаморфических пород, в том числе архейского возраста. Остальные минералы из группы фосфатов относятся к разряду редких или исключительно редких.

К сожалению, распространённости самой по себе для идентификации минерала-основы недостаточно, ибо мы слишком многого не знаем о геохимии раннего архея. В частности, широкая распространённость железистых кварцитов (*banded iron formation*) в осадочных породах архейского и протерозойского возраста, возможно, свидетельствует о высокой концентрации иона Fe^{2+} в морской воде в те времена. В таких условиях вероятно отложение железосодержащих фосфатов подобных вивианиту ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и анапаиту ($\text{Ca}_2\text{Fe}(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), встречающихся в менее древних седиментогенных железорудных месторождениях. Однако упоминаний о железосодержащих фосфатах в архейских осадках мне найти не удалось.

Есть ещё одна обширная, но малоизученная группа уранил-фосфатов со слоистой структурой, т.н. урановые слюдки, исключительно редкие в наши дни, представители которой, в принципе, могли иметь более широкое распространение в архее. В самом деле, все крупные урановые месторождения образовались в архее или протерозое. На знаменитом месторождении Витватерсранд в Южной Африке разрабатываются

конгломераты с окатанными зернами уранинита (U_3O_8). Очевидно уранинитовый песок в протерозое мог отлагаться в россыпях по берегам рек. Столь высокие концентрации урана могли бы привести и к накоплению уранил-фосфатов, таких, например, как отенит ($Ca(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot H_2O$) или торбернит ($Cu(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 12H_2O$). Каких-либо свидетельств подобных процессов описано не было, но это может быть связано с фрагментарностью наших знаний об осадконакоплении в архее.

Кристаллохимические критерии. Необходимость состыковки полинуклеотида, синтезируемого стемпингом, с гранью кристалла ортофосфата предполагают наличие у кристаллов искомого фосфата определённых граней, расположение тетраэдров PO_4 в которых сходно с расположением фосфатных групп в РНК (расправленной как на Рис 4-2). При ближайшем рассмотрении кристаллической структуры апатита в ней действительно обнаруживаются узловые плоскости, в которые можно «вставить» молекулу ДНК или РНК.

Напомним, апатит кристаллизуется в гексагональной сингонии, пространственная группа $P6_3/m$. Параметры решётки наиболее распространённых разновидностей – гидроксилapatита, фторапатита и хлорапатита, приведены в следующей таблице.

Таблица 4-1. Состав и параметры кристаллической ячейки основных разновидностей апатита.

End-Member	Fluorapatite	Chlorapatite
Hydroxyapatite		
Formula		
$Ca_5(PO_4)_3OH$	$Ca_5(PO_4)_3F$	$Ca_5(PO_4)_3Cl$
Z		
2	2	2
Cell Parameters		
a		
9.424	9.367	9.628
c		
6.879	6.884	6.764

Химические свойства апатита, их вариации и соответствующие им изменения кристаллической структуры были тщательно изучены ввиду большого промышленного значения минерала, его многочисленных и разнообразных применений (основной источник фосфатов, сорбент, катализатор, депозитарий радиоактивных отходов, поглотитель примесей, используемый для очистки грунтовых вод, материал, используемый для изготовления вживляемых протезов костей и зубов, люминофор; синтетические монокристаллы некоторых разновидностей используются как рабочие тела лазеров и как искусственные драгоценные камни).

Приведённые в таблице 4-1 данные соответствуют трём конечным членам серии твердых растворов. Природный апатит, как правило, представляет собой смесь с преобладанием одного из этих компонентов. Как видно из таблицы, параметры решётки всех трех разновидностей апатита очень близки. Природные апатиты в массе своей имеют почти одинаковые значения межатомных расстояний.

Необходимо отметить, что приведённые в Таблице 4-1 параметры решётки были получены посредством экстраполяции данных о параметрах природных апатитов смешанного состава. В химически чистых стехиометрических хлорапатите и гидроксилapatите симметрия понижается до моноклинной, группа $P2_1/b$, вследствие фазового превращения типа порядок-беспорядок. При этом трансляционный вектор \mathbf{b} вдоль одной из горизонтальных осей увеличивается в два раза: $b=2a$. Фторапатит такого

превращения не испытывает и остаётся гексагональным при всех температурах вплоть до комнатной.

Полиморфное фазовое превращение в апатите, сопровождающееся понижением симметрии, может стать препятствием к использованию этого минерала в качестве основы. Образующийся при повышенной температуре кристалл апатита должен иметь гексагональную симметрию, и понижение симметрии до моноклинной после охлаждения может привести к таким явлениям, как двойникование, возникновение доменов и мозаичность кристалла. Важно поэтому отметить необычную особенность минерала, заключающуюся в его способности сохранять гексагональную симметрию и принадлежность к пространственной группе $P6_3/m$ при наличии примесей или вакансий в позициях катионов. Хотя химически чистые, стехиометричные хлорапатит и гидроксилapatит являются моноклинными (при комнатной температуре), дифрактограммы большинства природных образцов хлорапатита и гидроксилapatита вполне удовлетворяют (гексагональной) группе симметрии $P6_3/m$. Небольшого количества примесей или вакансий, обычных в природных образцах, достаточно для стабилизации гексагональной фазы. (По этой же причине, при попытках низкотемпературного синтеза стехиометричного гидроксилapatита или хлорапатита обычно получают смесь двух фаз практически неотличимых по составу, но разной симметрии, [88].)

Кристаллическая структура апатита достаточно сложна для зрительного восприятия, Рис 4-7. Подробное её описание (с различных позиций) можно найти в известной монографии Поваренных [89], в статье Дж. Элиотта [90], а также в более современных публикациях [91-94].

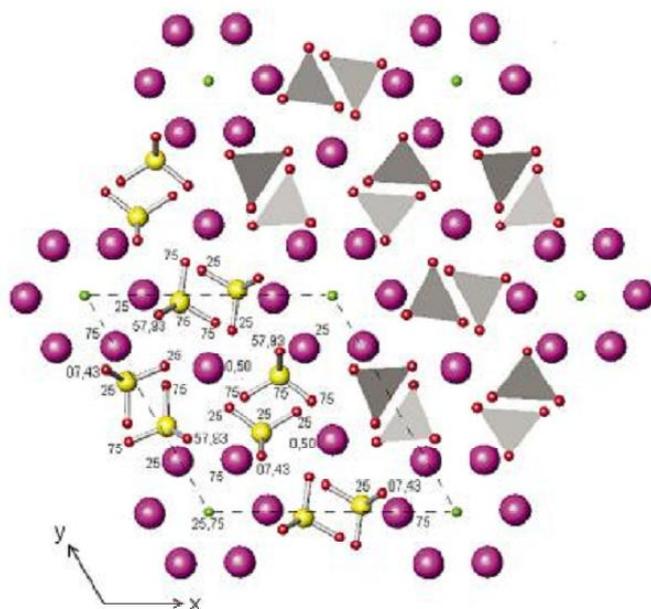


Рис 4-7. Кристаллическая структура фторапатита, спроецированная на базисную плоскость элементарной ячейки (0001); фосфатные тетраэдры изображены в двух вариантах: шары соединённые стержнями и треугольники; лиловые шары – ионы кальция, зелёные – ионы фтора; цифрами указаны относительные координаты узлов вдоль вертикального направления z . Из обзора [93].

В структуре апатита имеются две кристаллографически-неэквивалентные позиции атомов кальция, Ca1 и Ca2, и три позиции атомов O. Тетраэдры PO_4 в структуре связаны вместе колонками ионов Ca1. Атомы Ca2 объединяются в каналы, вытянутые вдоль оси z , в которых располагаются позиции т.н. «малого» аниона – F, Cl или OH. Упомянувшееся

выше понижение симметрии хлорапатита и гидроксилapatит до моноклинной связано с тем, что ионы Cl и OH закономерным образом смещаются вдоль оси каналов.

Возможности соотношения структур апатита и РНК (ДНК). Состыковка структур полинуклеотида и апатита предполагает равенство некоторых межатомных расстояний $\text{P}-\text{P}$ в кристалле соответствующему расстоянию между центрами фосфатных групп молекулы. Если взять за основу характерные расстояния между фосфатными группами в В-ДНК, полученные в рентгенографических исследованиях кристаллических олигомеров ДНК, то расстояние между ближайшими позициями атомов P в цепочке оказывается близким к 6.7 \AA . Для аморфных волокон В-ДНК расстояние $\text{P}-\text{P}$ для фосфодиэфирной связи оказывается меньше, в среднем 6 \AA . Далее, расстояние между атомами фосфора в уотсон-криковской паре должно быть близко к 18 \AA , как в двойной спирали В-ДНК. Кроме того, азотистые основания в цепочке ДНК не должны располагаться слишком близко друг к другу, так как это приведёт к значительному перекрытию π -орбиталей ароматических колец.

Указанные цифры представляют собой усреднённые характеристики. Сопоставление данных, полученных при рентгеноструктурном исследовании монокристаллов олигомеров ДНК и РНК, показывает, что их геометрические параметры меняются в широких пределах. Так, расстояние между соседними азотистыми основаниями (одной цепи) изменяется от 3 до 4 \AA , [95]. Расстояние между фосфатными группами в цепи обнаруживает ещё большие вариации, в зависимости от способа гофрирования фуранозных колец.

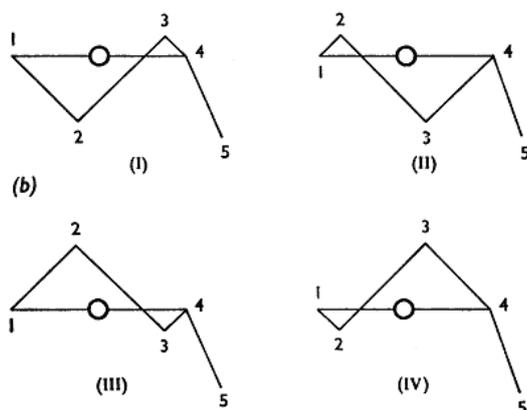


Рис 4-8. Конформации фуранозных колец (*sugar puckers*): (I) C_2' -endo;

(II) C_3' -endo; (III) C_2' -exo; (IV) C_3' -exo. Из работы [96].

Фуранозные кольца в нуклеиновых кислотах (т.е. кольца рибозы или дезоксирибозы) не являются плоскими. При рентгенографическом исследовании кристаллов мононуклеотидов и нуклеозидов было выявлено четыре основных конформации (т.н. *sugar pucker*), C_2' -endo, C_3' -endo, C_2' -exo и C_3' -exo, смотря по тому, который из двух атомов, C_2' или C_3' , более удалён от плоскости, проходящей через C_1' , O_5' и C_4' в направлении C_5' (*endo*) или противоположном (*exo*), Рис 4-8.

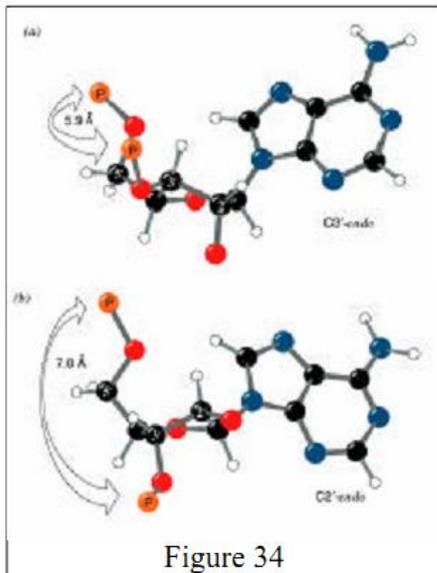


Рис 4-9. Расстояние между ближайшими атомами фосфора в цепочке ДНК может варьировать в широких пределах в зависимости от конформации фуранозного кольца рибозы.
Из лекции [87].

В зависимости от sugar pucker, расстояние между двумя ближайшими фосфатными группами в цепочке полинуклеотида меняется 5.9\AA для C_3' -endo до 7.0\AA для C_2' -endo - конформаций, Рис. 4-9.

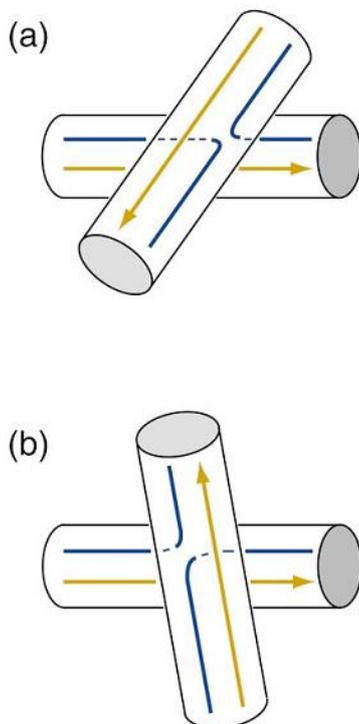


Рис 4-10. Конформации четверных соединений. A diagram showing the overall structural features of the two junction conformations. (a) The stacked-X conformation; (b), the crossed conformation. The continuous strands are indicated by gold lines and the crossover strands by blue lines.
Из работы [97].

В отдельных случаях расстояние между фосфатными группами в цепочках полинуклеотидов может меняться и в более широких пределах. Например, такие вариации были обнаружены в т.н. четверных соединениях (*four-way junctions*), т.е. комплексов, состоящих из двух нитей ДНК и двух нитей РНК или из четырёх нитей ДНК, с конформацией показанной на Рис. 4-10.

Расстояния (установленные рентгенографически) между атомами фосфора в сегменте цепочки ДНК непосредственно принимающем участие в четверном соединении меняются от 4.96 Å до 6.92 Å, см. данные в Таблице 2.

Таблица 4-2. Расстояния между фосфатными группами в сегменте цепочки нуклеотидов из четверного соединения (four-way junction). Из работы [97]

Nucleotide pairs	+55° junction	-80° junction
A30-G31	6.31	5.69
G31-G32	6.60	6.75
G32-C33	4.96	6.45
G31-A145	6.83	15.11
G32-C146	6.24	6.18
G144-A145	6.92	6.65
A145-C146	6.65	6.92
C146-T147	5.09	5.81

Distances are in Å; those shorter than 5.5 Å are shown in bold.

Длина уотсон-криковских пар, наверное, тоже может меняться; к сожалению, в моём распоряжении нет данных, позволяющих судить о пределах этих вариаций. В любом случае, уже выявленные пределы вариации расстояния P–P и расстояния между азотистыми основаниями соседних нуклеотидов в цепочке настолько широки, что позволяют «вставить» расплавленную ДНК в кристалл практически любого ортофосфата.

Правильное расположение полинуклеотидов на основе, при котором их фосфатные группы размещены в позициях тетраэдров PO₄, а фуранозные кольца ориентированы параллельно основе, вероятно не оставляет свободы для изменений в *sugar puckers*. Вследствие интенсивного ван-дер-Ваальсового взаимодействия фуранозных колец рибоз с основой, их *sugar pucker* будет, скорее всего, фиксирован, а потому и расстояние между фосфатными группами нуклеотидов будет иметь фиксированное значение. Но нам пока известно лишь, что оно лежит в пределах между 4.96 Å и 7.0 Å.

Если ориентироваться на усреднённые характеристики, расстояние P–P в цепочках кристаллических олигомеров кристаллической В-ДНК (6.7 Å) оказывается близким к величине параметра $c = 6.76 \text{ Å}$ элементарной ячейки хлорапатита. Если это совпадение не случайное, тогда две соседних фосфатных группы в цепочке полинуклеотида, укоренённого в основу, соотносятся с двумя тетраэдрами PO₄ в структуре апатита, связанными единичной трансляцией вдоль вектора c . Тем самым макромолекула оказывается вытянутой вдоль оси z , т.е. основа представляет собой некоторую грань гексагональной призмы.

Ограничиваясь призматическими гранями с простыми индексами, несколько способов размещения ДНК усматривается непосредственно на гранях $(10\bar{1}0)$, $(12\bar{3}0)$ и $(11\bar{2}0)$. Соответствующие геометрические параметры (вычисленные в предположении, что основа имеет параметры решётки кальциевого хлорапатита) представлены в таблице 4-3. (Расстояния между соседними азотистыми основаниями могут в строчках не могут быть точно вычислены из геометрических свойств основы, потому что эта величина зависит также от конформации гликозидной связи. Расстояния, представленные в последней колонке таблицы, представляют собой верхнюю оценку.) Изображения грани $(11\bar{2}0)$ апатита, простроенной двухцепочечными полинуклеотидами, представлены на Рис. 7-3 и 7-4.

Таблица 4-3. Геометрические характеристики нескольких способов укладки полинуклеотидов на гранях хлорапатита.

№	Грань кристалла	Расстояние Р—Р в цепочке /6 - 6.7Å в В-ДНК/	Расстояние Р—Р в уотсон-криковской паре /18Å для В-ДНК/	Расстояние между азотистыми основаниями [†] /~3 Å в В-ДНК, ~6 Å при наличии интеркалята / 5.5 Å
1	(10 $\bar{1}$ 0)	6.76Å	17.66 Å	5.5 Å
2	(12 $\bar{3}$ 0)	- “ -	18.3 Å	≤ 2.6 Å
3	(11 $\bar{2}$ 0)	- “ -	18.0 Å	6.3 Å
4	(11 $\bar{2}$ 0)	- “ -	17.1 Å	≤ 4.1 Å
5	(11 $\bar{2}$ 0)	- “ -	18.0 Å	≤ 3.7 Å

[†] В случае острого угла между осью удлинения уотсон-криковской пары и осью удлинения полинуклеотида только верхняя граница расстояния может быть оценена из параметров решётки

Лёгкость, с которой нами были обнаружены грани апатита, способные выступить в качестве основы при стемпинге, производит двойственное впечатление. С одной стороны, указаны грани, расположение фосфатных групп в которых согласуется с геометрическими характеристиками кристаллической В-ДНК. Причём все упоминаемые в Таблице 4-3 грани действительно наблюдались в огранке природных кристаллов апатита, [98]. С другой, возникает ощущение, что обнаружение подобных узловых плоскостей в целом не составляет проблемы для многих и многих кристаллических структур ортофосфатов. Иными словами, возможность использования грани кристалла апатита в качестве основы, усмотренная из геометрических соображений, не доказывает, что в качестве основы при синтезе родоначальной молекулы РНК был использован именно кальциевый апатит, а не какой-либо иной минерал из группы фосфатов.

Подводя итог, кальциевый апатит действительно удовлетворяет критериям, которые могут быть сформулированы исходя из геохимических и кристаллохимических соображений, но это ещё не позволяет с уверенностью утверждать, что репликация родоначальной РНК осуществлялась стемпингом граней именно этого минерала.

5. Дальнейшая конкретизация: свидетельства цитологические, палеобиологические, генетические.

Процессы синтеза полинуклеотидов, осуществляемые стемпингом минеральной основы, при всём их правдоподобии, остаются пока феноменом сугубо умозрительными. Кроме того, даже в случае если наша гипотеза о возникновении и начальном этапе эволюции верна, остается не идентифицированным ортофосфатный минерал основы. Геохимическим и кристаллохимическим критериям, изложенным в разделе 4.4 предшествующей главы, удовлетворяют многие фосфаты, хотя апатит, бесспорно, следует отнести к наиболее перспективным. В этих обстоятельствах представляется разумным обратиться к имеющимся данным об эволюционной истории живых существ. Если процессы стемпинга имели место, они должны были определённым образом повлиять на облик древнейших организмов и оставить след в геноме организмов современных. Фоссилизированные остатки организмов, использующих кристаллические ортофосфаты для стемпинга, могли сохраниться в древнейших породах, и их анализ может быть использован для идентификации минерала основы.

Первоначально, цель написания данной главы состояла в отыскании признаков стемпинга в современных организмах и в фоссилизированных остатках древнейших живых существ. Из нашего предположения о стемпинге апатитовой основы как о механизме добиологической эволюции можно вывести ряд заключений о последующем развитии событий. Сопоставление предсказаний с тем, что наблюдается в реальности, может служить аргументом «за» или «против» предлагаемой модели добиологической эволюции. При реализации указанной программы все более или менее конкретные предсказания, которые можно было измыслить, действительно подтвердились. Однако в процессе работы обнаружилось и нечто большее. Предсказания теории позволили разъяснить природу ряда явлений, до этого не находивших объяснения. Кроме того, прояснились и некоторые аспекты практического осуществления реакций полимеризации нуклеотидов стемпингом апатита. В итоге материал настоящей главы был значительно расширен.

5.1. Стемпинг на ранних стадиях молекулярной эволюции.

Мы постулируем, что в определённый момент времени на земле имелись условия для синтеза и репликации полинуклеотидов путём стемпинга граней кристаллов апатита. Стадии процесса стемпинга описаны выше, в разделе 4.2. Для их осуществления необходимо наличие кристалла апатита в контакте с раствором, который служил исходным резервуаром нуклеотидов. Нужна также динамическая смена условий, в результате которой имеет место циклическое чередование следующих стадий: адсорбция одноцепочечного полинуклеотида, (Рис 4-3 А), адсорбция мономеров нуклеотидов, образующих уотсон-криковские пары с нуклеотидами полимера (Рис 4-3 В), соединение адсорбированных моонуклеотидов фосфодиэфирными связями (Рис 4-3 Г), удаление образовавшегося таким образом двухцепочечного полинуклеотида с поверхности кристалла путём элюирования или путём растворения кристалла, денатурация полинуклеотида с образованием двух цепочек и, наконец, рассеяние двух образовавшихся цепочек в растворе.

Мы полагаем также, что на земле были созданы условия для молекулярной эволюции. Последнее включает в себя наличие в растворе каких-то молекул, обнаруживающих сродство к апатиту, сорбируемых его гранями, обладающих специфическими активностями, вследствие чего они могут быть использованы новообразованными рибозимами в качестве кофакторов. Процесс молекулярной эволюции, очевидно, не мог бы быть запущен при наличии избытка апатитовых кристаллов – если каждая молекула

получает доступ к основе и реплицируется, то репликации протекает как цепная реакция, с взрывом, и это приводит к мгновенному истощению исходного резервуара нуклеотидов без какой-либо эволюции.

В целом, из общих соображений довольно трудно предсказать, какие в точности условия должны быть созданы для запуска процесса молекулярной эволюции. Не ясна и роль случайности в исходе эксперимента: всегда ли создание аналогичных условий будет сопровождаться молекулярной эволюцией. Эти вопросы не могут быть разъяснены без специальных исследований, экспериментальных и теоретических. Интуитивно, по мере истощения исходного резервуара, судьба той или иной молекулы полинуклеотида в эксперименте, включающем стемпинг, будет в первую очередь определяться скоростью, с которой она реплицирует себя. Поэтому процесс отбора на ранних стадиях эволюции был, вероятно, нацелен на выработку молекулы РНК, кодирующей рибозим, способствующий скорейшему осуществлению стемпинга. Подобный рибозим, разумеется, способствовал репликации *всех* РНК, адсорбированных кристаллом. Молекулы, сами не являвшиеся рибозимами, но оказавшиеся вблизи, тоже могли быть реплицированы в большом количестве копий. Однако, после десорбции и денатурации, вновь образованные макромолекулы рассеивались, перемещались на другие кристаллы. При этом рибозимы в очередной раз оказывались в преимуществе, а остальные молекулы ускорить свою репликацию уже не могли. В условиях, когда скорость репликации становится ведущим фактором отбора, представляется целесообразным сконцентрироваться на трудностях, которые полинуклеотиды должны были преодолевать при стемпинге.

5.1.1. Трудности, возникающие при осуществлении репликации путём стемпинга.

Из общих соображений, полинуклеотиды, реплицирующиеся стемпингом апатитовой основы, должны были преодолевать трудности трёх типов. Первая трудность состоит в необходимости правильного укоренения одноцепочечной матрицы (кодирующей последовательности) в основе. Характер затруднений, возникающих в этой связи, непосредственно усматривается из рассмотрения двух укоренённых в основу цепочек, показанных на Рис 5-1. Левая цепочка укоренена правильно, правая – с нарушениями. Представляется весьма вероятным, что молекулярная эволюция должна была привести к появлению рибозима, способного расправлять молекулу одноцепочечного полинуклеотида в цепочке основы, устраняющего изгибы укореняющейся молекулы полинуклеотида.

Второе очевидное затруднение, возникающее при репликации РНК стемпингом, состоит в необходимости катализировать образование фосфодиэфирной связи. Эта реакция, состоящая в соединении двух нуклеотидов фосфодиэфирным мостиком, относится к группе реакций, именуемых реакциями переноса фосфата, самых медленных в биохимии. В клетках реакции переноса фосфата осуществляются при посредстве ферментов, являющихся наиболее эффективными из всех известных катализаторов. Способность рибозима катализировать образование фосфодиэфирной связи при стемпинге, несомненно, должна была стать одним из важнейших факторов молекулярного отбора.

Ещё одно препятствие к правильной репликации при стемпинге усматривается в возможной дефектности кристалла основы. Наличие дефектов кристаллической решётки на участке укоренения может привести к ошибкам репликации, поэтому вероятно возникновение рибозимов, способных диагностировать подобные нарушения, отсоединить матрицу от основы, переместить её в другой участок основы и там укоренить заново.

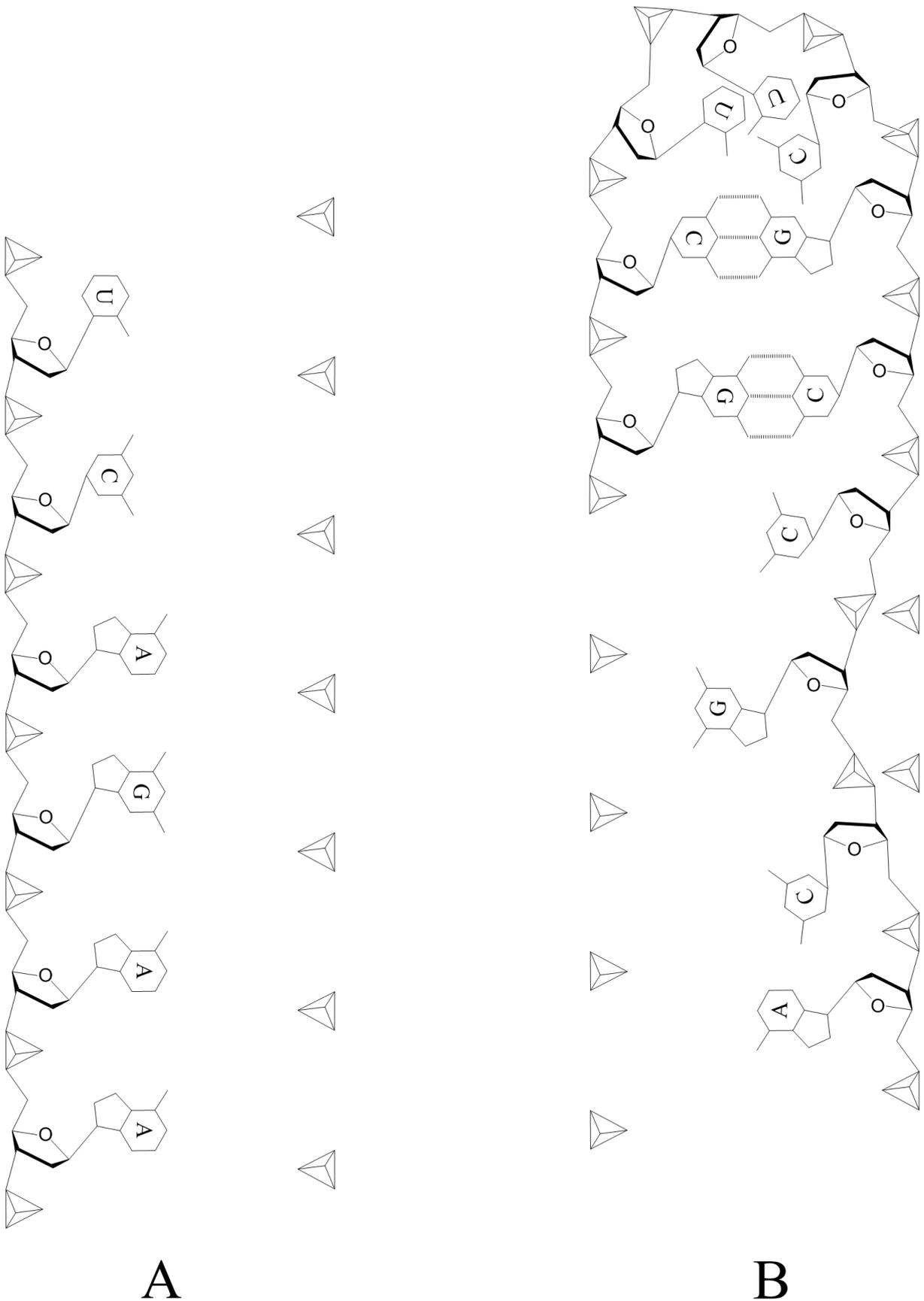


Рис 5-1. Сравнение правильного расположения одноцепочечного полинуклеотида в строчке основы (А) и с нарушениями (В).

Активности рибозима, способного переместить молекулу РНК из одного участка основы в другой, отчасти напоминают активности современных ДНК-транспозонов, работающих по схеме «вырезать и вставить» (cut-and-paste transposition). Однако современные транспозоны собственной каталитической активностью не обладают. Для проведения параллелей между ними и древнейшими рибозимами пока нет достаточных оснований. По понятным причинам нет сведений и о рибозиме, расправляющем молекулу РНК в основе. С другой стороны, известен целый ряд рибозимов, катализирующих образование фосфодиэфирной связи, и создаётся впечатление, что по крайней мере один из них был непосредственно задействован в стемпинге.

5.1.2. Интроны группы I.

Интроны – это участки ДНК, которые прерывают кодирующие последовательности генов. После транскрипции интроны удаляются из незрелой мРНК (пре-мРНК) в процессе сплайсинга. Обнаружение интронов стало одной из самых больших неожиданностей за всю историю молекулярной генетики, [678,685]. Вопросы о возможном происхождении интронов, функциях, влиянии на организм, поставленные после их открытия в конце 1970-х, составляют предмет оживлённой дискуссии по сие время. Одни интроны содержат открытую рамку считывания (Open Reading Frame, ORF), т.е. они кодируют белки, в других ORF не обнаруживается. Некоторые специалисты считают интроны с ORF более древними, а не содержащих ORF – редуцированной формой, поскольку интроны с ORF обладают свойством мобильности, характерной для паразитических форм ДНК, [683]. Однако большинство склоняется к тому, что изначально все интроны не имели ORF, поскольку не содержащие ORF интроны группы I и группы II (см. ниже) часто обнаруживают способность к аутосплайсингу *in vitro*, [679].

Известно не менее четырёх основных групп интронов, выделяемых по структуре и по механизму реакции сплайсинга:

- (i) Сплайсосомные интроны. Обнаруживаются в кодирующей белки ядерной ДНК эукариотов, удаляются сплайсосомой, [680,685].
- (ii) Интроны в генах, кодирующих транспортную РНК (тРНК) архей и эукариотов, удаляются специализированными белковыми ферментами, [681], изредка те же интроны обнаруживают в кодирующих генах архей, [685].
- (iii) Интроны группы I. Обнаруживаются в тРНК и рибосомной РНК (рРНК) бактерий, в фагах, в рРНК эукариотов, отсутствуют в археях; удаляются аутосплайсингом [682,684].
- (iv) Интроны группы II. Обнаруживаются в геномах бактерий, а в эукариотах их находят в генах хлоропластов и митохондрий, удаляются аутосплайсингом [679,685].

Нас в данном разделе будут интересовать, главным образом, группы I. Именно эти интроны являются рибозимами с набором активностей, многие из которых оказываются бесполезными в современных живых клетках, но которые могли быть использованы при полимеризации нуклеотидов стемпингом.

Наиболее известна способность интронов группы I осуществить аутосплайсинг, т.е. реакцию, в ходе которой интрон иссекает собственную последовательность из молекулы РНК, одновременно с этим лигируя образующиеся свободные концы. Для нескольких интронов группы I эта реакция может быть осуществлена *in vitro* без участия внешних факторов, однако для этого необходимы повышенные температуры и высокие концентрации солей. При физиологических условиях собственной активности фермента недостаточно для осуществления аутосплайсинга, поэтому *in vivo* реакция протекает с

использованием внешних факторов, причём в одних случаях факторы кодируются в **ORF** самого интрона, а в других поставляются клеткой, [684].

Помимо аутосплайсинга, интроны группы I способны катализировать ряд реакций, сопровождающихся образованием, разрывом или переэтерификацией (переносом) фосфодиэфирной связи [686]. Природный рибозим демонстрирует узкую специфичность, однако эволюцией *in vitro* были получены его модификации, осуществляющие разрыв фосфодиэфирной связи для различных РНК-субстратов, а также и для ДНК, [686,687]. Были получены модификации рибозима, катализирующие матричный синтез РНК (template-directed synthesis, см. выше, раздел 3.2), [689,693]. Высказывались предположения, что интрон группы I представляет собой древнейшую полимеразу, сохранившуюся со времён мира РНК. Именно на основе интрона группы I селекцией *in vitro* был получен рибозим, способный к репликации некоторых фрагментов собственной молекулы, изображённый на Рис 2-1. Однако степень соответствия принципу комплементарности (*fidelity*) оказалась очень низкой, исключающей успешную передачу наследственной информации. В среднем 35% образуемых пар нуклеотидов не являются уотсон-криковскими, [678].

Помимо реакций с образованием, разрывом или переносом фосфодиэфирной связи, интроны группы I способны обнаруживают способность катализировать реакцию обратную аминоацилированию (аминоацилированием называется реакция связывания аминокислоты с соответствующей ей молекулой тРНК), [688]. Авторы цитируемой работы видят в наличии такой активности указание, что интрон группы I мог быть аминоацил-тРНК синтетазой.

Альтернативная гипотеза происхождения интронов группы I состоит в том, что эти рибозимы являются потомками паразитических молекул РНК, сохранившимися со времён мира РНК, [690]. Интрон, согласно гипотезе, встраивался в молекулы РНК используя т.н. обратный сплайсинг (*inverse splicing*) – реакцию, обратную аутосплайсингу, тем самым принуждая их производить собственные копии. Противники данной гипотезы отмечают, что столь древнее происхождение плохо согласуется с наблюдаемым спорадическим распространением интронов группы I в современных геномах, а более всего – с отсутствием их в геномах архей, [684]. Кроме того, гипотеза не объясняет почему, помимо аутосплайсинга, интрон способен катализировать и другие реакции.

Наличие у интрона группы I двух активностей, первая из которых состоит способности катализировать обратный сплайсинг и аутосплайсинг, а вторая заключается в способности катализировать образование фосфодиэфирной связи (в отсутствие способности регулировать степень соответствия принципу комплементарности), находит естественное объяснение, если предположить, что этот рибозим использовался в качестве полимеразы при стемпинге. В самом деле, высокий уровень соответствия принципу комплементарности при стемпинге гарантируется стерическими особенностями процесса т.е., в конечном счёте, геометрическими особенностями основы. Стадия стемпинга, на которой имеет место образование фосфодиэфирных связей, осуществляется уже после того, как все уотсон-криковские пары сформированы. Тем самым, рибозим, осуществляющий катализ, в отличие от современных полимераз, не должен обладать селективностью, позволяющей катализировать образование связи лишь для нуклеотидов, образовавших уотсон-криковские пары. Далее, способность интрона группы I внедриться в молекулу РНК посредством обратного сплайсинга, а затем высвободиться посредством аутосплайсинга, лигировав образовавшиеся концы, не причиняя вреда реплицируемой молекуле, наводит на мысль, что этот рибозим входил в симбиотические взаимоотношения с реплицирующимися рибозимами мира РНК (и не был паразитом).

В последующем, интрон группы I мог быть использован для катализа фосфодиэфирной связи при стемпинге на клеточной стадии эволюции, во всё время, ушедшее на создание *bona fide* полимераз. В разделах 5.5.2 и 5.10 предложена гипотеза эволюции интронов группы I, согласно которой эти интроны сохранились до наших дней потому, что в

момент, предшествующий возникновению предков эукариотов, транскрипция и обратная транскрипция у предков бактерий всё ещё осуществлялась стемпингом апатита. Отсутствие этого интрона у архей связано с тем, что предки архей к тому времени уже обзавелись *bona fide* полимеразой (для репликации РНК).

Гипотеза о происхождении и биологическом предназначении двух других активностей интрона группы I – способности катализировать аминоацилирование, а также способность его лигировать собственные концы с образованием кольцевой молекулы – изложена в разделе 5.5.

Помимо интронов группы I, имеется ещё один интрон, обнаруживающий свойства рибозами – интроны группы II. Однако, в отличие от интронов группы I, набор катализируемых реакций существенно уже: они способны катализировать аутосплайсинг, обратный сплайсинг, а также реакцию лигирования собственных концов с образованием кольцевой молекулы. По аналогии с интронами группы I, можно предположить, что интроны группы II тоже возникли в мире РНК, что они как-то взаимодействовали с РНК-геномами, встраиваясь в них в одних условиях путём обратного сплайсинга, реплицируясь вместе с хозяйским геномом, затем покидая хозяйский геном путём аутосплайсинга. Поскольку у интронов группы II не описаны активности, потенциально способные составить основу для симбиотических отношений с другими молекулами, можно предположить, что этот интрон возник как паразитическая молекула мира РНК. Впрочем, нельзя исключить, что полезные свойства будут обнаружены при исследовании взаимодействия интронов группы II с нуклеиновыми кислотами, адсорбированными апатитом. Возможно, интрон группы II или его РНК-реплика и была рибозимом, расправлявшим молекулу одноцепочечного полинуклеотида в строчке основы.

Если изложенная здесь гипотеза о природе интронов группы I верна, тогда они могут быть использованы при экспериментальном воспроизведении реакций полимеризации нуклеотидов стемпингом апатита в лабораторных условиях. Этим, возможно, будет открыт путь для получения полинуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов или из преактивированных нуклеотидов в условиях, когда фосфодиэфирная связь не является термодинамически стабильной. Разумеется, необходимо проверить экспериментальным путём, сохранится ли каталитическая активность интронов группы I в отношении субстратов, адсорбированных апатитом.

Выше уже было упомянуто, что аутосплайсинг интронов группы I и группы II при физиологических условиях осуществляется при участии белковых факторов, т.н. матураз (*maturase*). Аутосплайсинг иногда может быть осуществлён *in vitro*, в отсутствие матураз, но лишь в условиях, далёких от физиологических – при повышенной температуре (45°C), при высоких концентрациях $MgCl_2$ или $ZnSO_4$, повышенных концентрациях электролитов (таких как $(NH_4)_2SO_4$), [691,692]. Очевидно, физико-химические свойства среды, оптимальные для аутосплайсинга интронов групп I и II, близки к условиям, наблюдаемым вблизи выходов геотерм. Ниже, в разделе 5.2 показано, что жизнь на её ранних стадиях только и была возможна вблизи геотерм, поставлявших кристаллы апатита подходящего качества. Тем самым, условия, оптимальные для аутосплайсинга (в отсутствие матураз), совпадают с условиями, в которых интроны группы I и группы II должны были функционировать около четырёх миллиардов лет назад, когда ни матураз, ни каких-либо иных белков ещё не существовало. Современный оптимум совпадает с условиями, в которых эти рибозимы возникли в процессе молекулярной эволюции.

5.1.3. Униформизация нуклеотидов.

Исходный резервуар, вероятно, содержал равные количества нуклеотидов четырёх возможных типов: α -D, β -D, α -L и β -L (символы α и β соответствуют аномеру, а D и L – энантиомеру). Выше, при обсуждении процессов стемпинга в части 4.3 было показано, что цепочки полинуклеотидов, образующиеся в ходе этого процесса, должны

преимущественно состоять из молекул одного типа. При этом в зависимости от локальной симметрии грани, используемой в качестве основы, вероятно образование двухцепочечных молекул, состоящих из антипараллельных цепочек α - α или β - β , или же параллельно ориентированных цепочек α - β . Предположим, локальная симметрия основы способствовала образованию антипараллельных цепочек (как в современных двухцепочечных ДНК и РНК).

Мы не знаем, сколь значительной может быть селективность процесса стемпинга в отношении энантиомеров и аномеров, однако она заведомо не могла быть абсолютной. Речь может идти о превалировании нуклеотидов одного типа в каждой отдельной двухцепочечной молекуле, но превалирование это не было стопроцентным. Кроме того, рибозимы, состоящие из нуклеотидов одного типа, скажем β -D, могли использовать в качестве кофакторов нуклеотиды иного типа, α -L например (использование нуклеотидов в качестве кофакторов описано для некоторых рибозимов). В этой связи возникает вопрос: как эволюция макромолекул, образующихся в процессе стемпинга, не обеспечивающем абсолютной селективности в отношении аномеров и энантиомеров, могла привести к сохранению лишь β -D-нуклеотидов в современных организмах?

Селективность процессов стемпинга в отношении аномеров и энантиомеров должна была привести к возникновению и сосуществованию четырёх типов самовоспроизводящихся двухцепочечных полинуклеотидов – состоящих преимущественно из α -D, β -D, α -L и β -L нуклеотидов. Сосуществующие в первичном резервуаре четыре формы (пред)жизни, вероятно, развивались более или менее независимо одна от другой, с разной скоростью. Поэтому исчерпание исходного резервуара нуклеотидов тоже шло с разной скоростью для разных энантиомеров и аномеров. Рано или поздно концентрация одного из типов нуклеотидов, скажем β -D-нуклеотидов, должна была достигнуть угрожающе низких значений. Молекулы, состоящие из нуклеотидов этого класса, должны были отреагировать и вывести в своей среде рибозимы, способные синтезировать нуклеотиды из каких-то более простых органических соединений. Это позволило β -D-цепочкам благополучно пережить момент исчерпания исходного резервуара в отношении соответствующих мономеров. Вероятно, цепочки, состоящие из β -D-нуклеотидов, освоили синтез нуклеотидов именно этого класса.

Далее, если рибозим, состоящий преимущественно из β -D-нуклеотидов, в качестве кофактора использовал α -L- нуклеотид, это рано или поздно должно было стать источником затруднений, после исчерпания резервуара в отношении α -L-нуклеотидов. В принципе, рибозимы могли бы освоить синтез и этого типа нуклеотидов, подобно тому, как ранее ими был освоен синтез нуклеотидов β -D-типа, однако такой путь является эволюционно затратным. Синтез мононуклеотидов *de novo* – это задача сложная. Значительно проще видоизменить исходный рибозим так, чтобы вместо α -L-нуклеотида он использовал соответствующий β -D-нуклеотид в качестве кофактора. В практике экспериментов по молекулярной эволюции *in vitro* известны примеры переходов с одного кофактора на другой, когда кофактор рибозима меняется на другую молекулу сходной структуры. Такие переходы могут быть осуществлены сравнительно быстро. Таким образом, β -D-цепочками был освоен синтез β -D-нуклеотидов, и этого оказалось достаточно.

В силу каких-то причин, остающихся загадкой, в ходе последующей эволюции в природе сохранились только β -D-цепочки, а остальные три формы реплицирующихся полинуклеотидов исчезли. Поскольку синтез нуклеотидов, не относящихся к типу β -D, выжившими полинуклеотидами освоен не был, наступило тотальное единообразие нуклеотидов в отношении аномеров и энантиомеров.

5.2. Роль геотерм.

Репликация и транскрипция стемпингом предполагают физический контакт осуществляющего их организма с поверхностью кристалла. Если наше предположение о роли апатита в происхождении жизни верно, жизнь на самом раннем, начальном её этапе была вся локализована на гранях кристаллов этого минерала. На суше и на дне океана в раннем архее могли присутствовать лишь два типа кристаллов апатита: песчинки, высвобождающиеся при выветривании кристаллических пород (интрузивных или метаморфических), и кристаллы, образующиеся вблизи геотермальных источников. Осадочных фосфоритов в те времена быть не могло. Все известные типы фосфоритов образуются при разложении органики, совокупная масса которой должна была быть поистине ничтожной, коль скоро всё живое было сосредоточено на поверхности апатитовых кристаллов.

Вопрос об огранке апатитовых кристаллов в данном случае имеет принципиальное значение. Апатитовые песчинки, окатанные и лишённые граней, не представляли большого интереса в рассуждении репликации или транскрипции (если речь идёт о существах, чьи геномы соизмеримы с геномами организмов современных). В гидротермальных же отложениях часто обнаруживаются хорошо огранённые кристаллы.

В моём распоряжении есть лишь отрывочные сведения об апатите из современных геотерм, доступные через интернет. Из них невозможно составить общей картины. Тем не менее, выделения этого минерала действительно были описаны в геотермальных полях Вай-О-Тапу, Новая Зеландия [99], Бакон-Манито, Филиппины [100], Каверау, Новая Зеландия [101], некоторых других [102,103]. Кристаллы апатита были встречены в осадках в районе подводной гидротермальной активности, т.н. *черных курильщиков (black smokers)* в восточной части Тихого Океана [104]; этот апатит, впрочем, мог иметь и биогенное происхождение. Деятельностью подводных геотерм аналогичных *чёрным курильщикам* объясняют происхождение апатит-магнетитовых руд вулкана Эль Лако, Чили [105]. В целом, возможность образования кристаллов апатита у выходов геотерм, в том числе подводных, сомнений не вызывает.

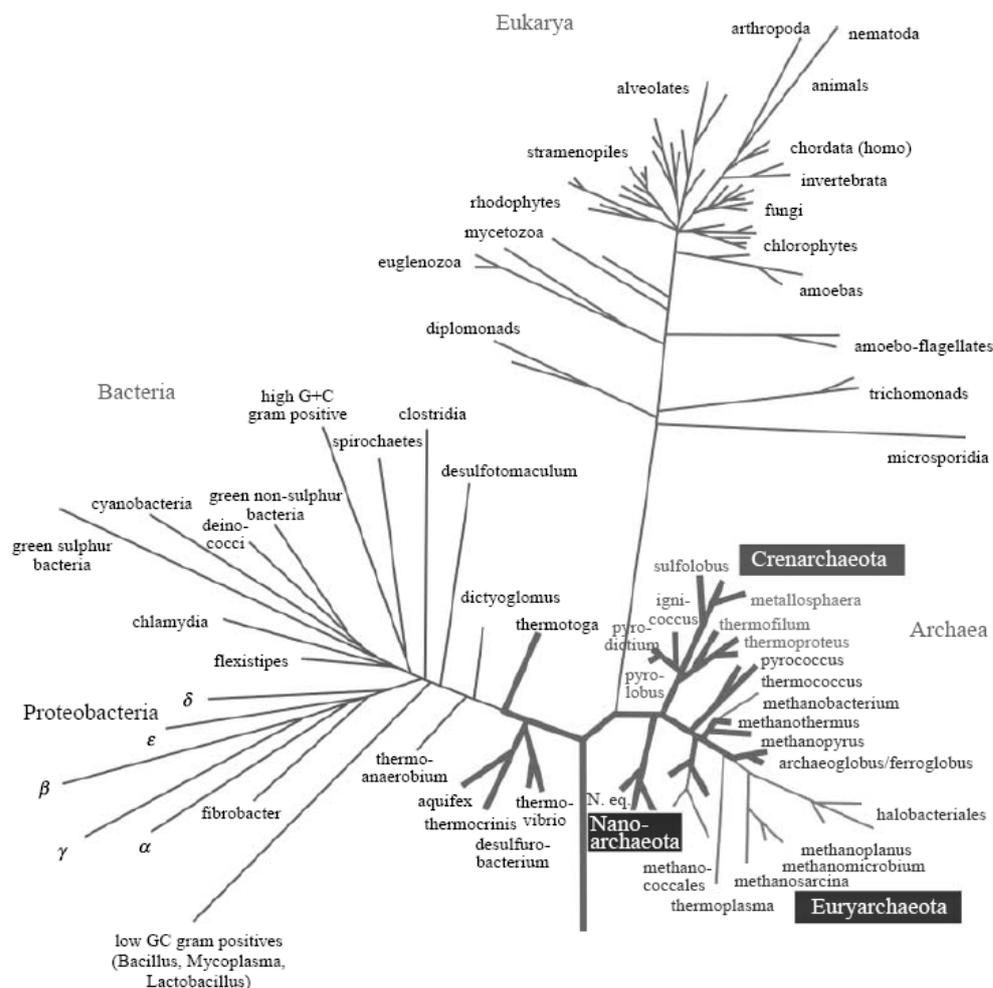


Рис 5-2. Филогенетическое древо жизни, основанное на сопоставлении РНК из малой субъединицы рибосомы. Утолщёнными линиями выделены гипертермофилы (*hyperthermophiles*). Из обзора [106].

Напрашивается вывод, что вся жизнь в начальный её этап «тепилась» вблизи геотермальных источников, восполнявших запасы кристаллов того вещества, которое Дарвин в «Происхождении Видов» назвал «столь ценным известковым фосфатом» (*the precious phosphate of lime*), [107]. Древнейшие организмы, тем самым, должны были адаптироваться к типичным для этой среды обитания высоким температурам. Последнее предположение нетрудно проверить, поскольку накопленный объём данных о филогенетических взаимоотношениях между современными микроорганизмами позволяет делать выводы о том, какие организмы возникли раньше, а какие – позже. На Рис. 5-2 представлено полное филогенетическое древо всех форм жизни. Глубина укоренения на этом древе служит мерой древности соответствующей группы организмов. Ветви гипертермофилов (т.е. организмов, живущие при температуре 80° С и выше) нанесены ушренными линиями. Как можно видеть, гипертермофилы – это пять наиболее древних групп: *Aquificales* и *Thermotogales* в домене бактерий и *Nanoarchaeota*, *Pyrodictiaceae* и *Methanopyraceae* в домене архей.

Расположение гипертермофилов на филогенетическом древе указывает, что все они происходят от одного общего предка, [106]. Вывод о том, что древнейшие живые существа были гипертермофилами, и что жизнь, следовательно, возникла в выходах геотерм, был сделан более двадцати лет назад на основании данных филогенетического анализа. Вывод этот выдержал проверку временем, однако точные причины явления

оставались неизвестными. Наибольшее распространение получила точка зрения, согласно которой древнейшие организмы тяготели к горячим источникам, поскольку нуждались в пище и энергии.

С точки зрения развиваемой здесь гипотезы Происхождения, организмы просто не могли воспроизводиться вне кристаллов, которые можно было обнаружить только вблизи выходов геотерм. Ориентация же их на механизмы питания и дыхания, основанные на веществах, доступных в геотермах (описанные в цитируемом выше обзоре [106] и содержащихся в нём ссылках), представляют собой следствие их образа жизни, а не причину. Первопричина заключается в практикуемом механизме репликации и транскрипции.



Рис 5-3. Друза кристаллов апатита.

Здесь и далее примитивные организмы, осуществляющие репликацию и транскрипцию на абиогенных кристаллах апатита, будут называться *друзовиками*. Подобно современным собирателям минералов, они были большие охотники до друз, таких как изображённая на Рис. 5-3. Однако, в отличие от коллекционеров, друзовики проявляли интерес лишь к одному минеральному виду, а оказавшиеся в их обладании кристаллы быстро утрачивали блеск.

5.3. Роль химических свойств поверхности апатита.

Процесс стемпинга – это поразительное явление, которое, видимо, только и могло осуществить абиогенный синтез полинуклеотидов и их репликацию. Однако одного этого процесса, очевидно, недостаточно для возникновения жизни. Минерал, используемый в качестве основы, помимо способности выступить в таковом качестве, должен также обладать свойствами сорбента и катализатора.

В самом деле, добиологическая эволюция должна была быть направленной на совершенствование репликации *per se* лишь на самой начальной стадии, до исчерпания исходного резервуара нуклеотидов. По мере истощения резервуара, эволюционирующие рибозимы, очевидно, лишённые сложнейших молекулярных машин современных организмов, каким-то образом сумели в кратчайшие сроки освоить синтез всех четырёх нуклеотидов из простых неорганических соединений, таких как CO_2 или HCO_3^- . На мой взгляд, чудо это могло осуществиться лишь потому, что минерал, используемый в качестве основы, обладал также активностями катализатора и сорбента.

По мере исчерпания исходного резервуара нуклеотидов, молекулы рибозимов, функционировавших на поверхности апатита, могли освоить синтез нуклеотидов из молекул, адсорбированных этим минералом. Некоторые из этих молекул могли быть присоединены к рибозимам для придания им новых каталитических функций, подобно

кофакторам современных ферментов. Другие молекулы могли быть использованы в качестве исходных для синтеза. Весьма вероятно, что и основа сама по себе могла обладать каталитической активностью, и рибозимы могли ею воспользоваться.

Позднее, процесс исчерпания резервуара исходных ресурсов мог идти параллельно с возникновением и совершенствованием всё новых рибозимов, использующих всё более простые молекулы в качестве сырья для получения кофакторов и промежуточных метаболитов, из которых затем производились нуклеотиды. Затем, с появлением полипептидов, обладающих более замысловатой структурой и превосходящих рибозимы по своим каталитическим свойствам, отпала необходимость и в самих рибозимах, и в каталитической активности основы. Однако возникающие ферменты использовали те же кофакторы, и синтез нуклеотидов осуществлялся примерно через те же стадии.

Из сказанного следует, что химизм современных организмов во многом должен быть предопределён набором молекул, изначально присутствовавших на поверхности основы, и набором реакций, катализируемых основой. Тем самым, апатит должен обладать способностью адсорбировать биологически-значимые молекулы и катализировать биохимические реакции (или аналогичные им). Если в качестве основы действительно использовался апатит, то свойства апатита должны в известной мере предопределить химизм современных живых существ. К счастью, химические свойства поверхности апатита хорошо изучены, поэтому вопрос о возможности соотнесения двух химизмов вполне решаем. Ниже делается очень краткая, предварительная попытка такого сопоставления.

5.3.1. Адсорбционная активность. Роль апатита в возникновении дыхания.

Как объяснено выше, предположение об использовании Природой апатита в качестве основы при синтезе родоначальной РНК предполагает, что этот минерал должен обладать способностью адсорбировать на своей поверхности биологически значимые молекулы. Таковая активность у апатита действительно имеется, и об этом хорошо известно благодаря успехам и повсеместному распространению апатитовой хроматографии. Минералы группы апатита способны извлекать из раствора такие соединения, как нуклеиновые кислоты и пептиды, гликозаминогликаны, пирофосфат и другие полифосфаты. Однако наиболее знаменательным в контексте данного раздела представляется высокое сродство к апатиту молекул, участвующих в качестве кофакторов (коферментов) и промежуточных метаболитов при ассимиляции неорганического углерода.

В современных автотрофных организмах идентифицировано шесть путей ассимиляции неорганического углерода (два из которых были обнаружены лишь несколько лет тому назад): *Calvin cycle*, *reductive citric acid cycle*, *reductive acetyl-coenzyme A pathway*, *3-hydroxypropionate bicycle*, *hydroxypropionate - hydroxybutyrate cycle* и *dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle*. Описание указанных циклов имеется в обзоре [108], посвященном вопросам сравнительного описания циклов и их возможного происхождения. Их основные характеристики приведены в Таблице 5-1, позаимствованной в той же статье.

Таблица 5-1. Механизмы автотрофной фиксации углерода.

Из обзора [108]

Pathway*	ATP equivalents for synthesis of one pyruvate	Reductants for synthesis of one pyruvate (10 [H])	CO ₂ -fixing enzymes	Active CO ₂ species	Intermediates that can be used for biosynthesis	Carbon isotope fractionation [†]	Key enzymes
Reductive pentose phosphate cycle (Calvin–Benson–Bassham cycle)	Seven	Five NADH or NADPH	RubisCO	CO ₂	3-Phosphoglycerate, triose phosphates and sugar phosphates	–20 to –30 ‰ ^{113,114}	RubisCO and phosphoribulokinase
Reductive citric acid cycle (Arnon–Buchanan cycle)	Two [‡]	Two NADH or NADPH, one unknown donor [§] and two ferredoxin [¶]	2-Oxoglutarate synthase	CO ₂	Acetyl-CoA, pyruvate, PEP, oxaloacetate, succinyl-CoA and 2-oxoglutarate	–2 to –12 ‰ ^{115,116}	2-Oxoglutarate synthase and ATP-citrate lyase
			Isocitrate dehydrogenase	CO ₂ [‡]			
			Pyruvate synthase PEP carboxylase	CO ₂ HCO ₃ [–]			
Reductive acetyl-CoA pathway (Wood–Ljungdahl pathway)	Approx. one	Three ferredoxin [¶] and two F ₄₂₀ H ₂ (in methanogens)	Acetyl-CoA synthase–CO dehydrogenase	CO ₂	Acetyl-CoA and pyruvate	< –30 ‰ ^{83,115,117}	Acetyl-CoA synthase–CO dehydrogenase and enzymes reducing CO ₂ to methyltetrahydropterin
			Formylmethanofuran dehydrogenase (in methanogens)	CO ₂			
			Pyruvate synthase	HCO ₃ [–]			
3-Hydroxypropionate bicycle	Seven	Six NADH or NADPH, but one FAD is reduced	Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase	HCO ₃ [–]	Acetyl-CoA, pyruvate and succinyl-CoA	–12.5 to –13.7 ‰ ^{118–120}	Malonyl-CoA reductase, propionyl-CoA synthase and malyl-CoA lyase
3-Hydroxypropionate–4-hydroxybutyrate cycle	Nine	Six NADH or NADPH, but one FAD is reduced	Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase	HCO ₃ [–]	Acetyl-CoA and succinyl-CoA	–0.2 to –3.8 ¹²¹	Acetyl-CoA–propionyl-CoA carboxylase, enzymes reducing malonyl-CoA to propionyl-CoA, methylmalonyl-CoA mutase and 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase
Dicarboxylate–4-hydroxybutyrate cycle	Five	Two or three ferredoxin [¶] , one or two NADH or NADPH, and one unknown donor	Pyruvate synthase PEP carboxylase	CO ₂ HCO ₃ [–]	Acetyl-CoA, pyruvate, PEP, oxaloacetate and succinyl-CoA	–0.2 to –3.8 ¹²¹	4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase

CoA, co-enzyme A; F₄₂₀, deazaflavin factor 420; FAD, flavin adenine dinucleotide; PEP, phosphoenolpyruvate; RubisCO, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase–oxygenase. *Alternative name of pathway is provided in brackets. †In biological processes, when inorganic carbon is used to make organic compounds, ¹²C is more weakly bonded and reacts more readily than ¹³C because of its lighter mass. This means that organic matter tends to become enriched in ¹²C (and depleted in ¹³C; therefore negative sign) relative to the reservoir of inorganic carbon from which it has been drawn. Carbon stable isotopic fractionations are measured relative to a fossil belemnite standard (the PDB standard). Isotopic fractionations are normally small and so values are measured in parts per thousand (‰) and expressed as δ¹³C ‰ as follows: δ¹³C ‰ = [(¹³C/¹²C)_{sample} / (¹³C/¹²C)_{standard}] / [(¹²C/¹²C)_{standard}] × 1000. ‡The presence of biotin-dependent 2-oxoglutarate carboxylase in, for example, *Hydrogenobacter thermophilus*¹²², can increase the energy requirements of the cycle. †NADH in *Hydrogenobacter thermophilus*¹²². †Note that reduction of ferredoxin may be energy driven²⁴, which would increase the energy demands of the ferredoxin-dependent pathways.

Если в указанных шести циклах, абстрагировавшись от разнообразных и многочисленных ферментов, сконцентрироваться на кофакторах и промежуточных метаболитах, то оказывается, что подавляющее их большинство принадлежит к классам соединений с кислотными группами. Взаимодействие таких соединений с апатитом детально проанализировано в главе 6 настоящей работы. Здесь достаточно будет ограничиться пояснением, что указанные соединения, такие как пиррофосфат, нуклеотиды (НАДФ, АТФ, АДФ), карбоновые кислоты (*pyruvate*, *phosphoenolpyruvate*, *oxaloacetate*, (*S*)-*malate*, *fumarate*, *succinate*), фосфаты сахаров (*fructose 1,6-bisphosphate*, *2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate*, *xylulose-5-phosphate* и др.), глицерофосфаты, кофермент А и его соединения (*acetyl-CoA*, (*S*)-*3-hydroxybutyryl-CoA*, *crotonyl-CoA*, *4-hydroxybutyryl-CoA*, *succinyl-CoA*, *methylmalonyl-CoA*, *3-hydroxypropionyl-CoA*, *acryloyl-CoA*, *propionyl-CoA* и др.), проявляют высокое сродство к апатиту. Все эти вещества испытывают хемосорбцию апатитом при повышенных концентрациях некоторых катионов, таких как Ca²⁺ и Al³⁺ (на уровне десятых долей моля); концентрация Mg²⁺ и PO₄^{3–} при этом должна быть низкой. Если же создать повышенную концентрацию PO₄^{3–} и низкую Ca²⁺, то все указанные молекулы разом испытают десорбцию и перейдут в раствор.

Высокое сродство коферментов и промежуточных метаболитов, участвующих в ныне функционирующих шести циклах ассимиляции CO₂ и HCO₃[–], к апатиту служит серьёзным аргументом в поддержку предлагаемой теории Происхождения. Есть ещё один класс соединений, сродство которых к апатиту, вероятно, предопределило химизм современных форм жизни – аминокислоты. Способность апатита сорбировать протеиногенные аминокислоты детально обсуждается ниже, в разделе 6.3.7.1. В разделе 5.5 предложена

модель возникновения трансляции, в которой помимо средства аминокислот к апатиту задействована также способность этого минерала катализировать образование пептидной связи.

5.3.2. Роль каталитической активности апатита.

Если минерал, используемый в качестве основы, обладает к тому же некоторой каталитической активностью, Природа могла ею воспользоваться как возможностью для получения новых нуклеотидов. Впоследствии, с появлением ферментов, были найдены более эффективные способы воспроизводства нуклеотидов, и надобность в каталитической активности минерала-основы отпала. Тем не менее, выбор магистральных путей синтеза нуклеотидов, а также и других биологически значимых молекул, мог быть в известной мере предопределён набором реакций, катализируемых минералом основы.

Многие минералы, в том числе достаточно широко распространенные, такие например как цеолиты, гидроталькит или монтмориллонит, обладают ярко выраженной каталитической активностью. Минералы группы апатита тоже используются в качестве катализаторов. К сожалению, вопрос о степени сходства реакций, катализируемых апатитом, с реакциями, катализируемыми ферментами и рибозимами в современных живых клетках, чересчур сложен для того, чтобы пытаться решить его здесь. Поиск данных о каталитической активности апатита затруднён их рассредоточенностью по разнообразным тематическим изданиям. Например, способность кальциевого гидроксилapatита катализировать образование связи C–N, используемая при получении β-аминокислот, изучается в статьях по фармакологии, а статья о способности этого же минерала инициировать полимеризацию капролактона обнаруживается в журнале, посвящённом стоматологическому материаловедению, катализируемый гидроксилapatитом гидролиз хлорбензола будет описан где-либо ещё и т.д. При беглом обзоре обнаруживается около дюжины типов реакций, катализируемых апатитом, с образованием связей C–C, C=C, C–N и C–S и других. Ниже показаны лишь несколько примеров таких реакций, для которых проведение биохимических аналогий более или менее очевидно.

Имеется также большое количество публикаций, посвящённых каталитической активности апатита (в большинстве случаев это фторапатит или гидроксилapatит), в котором ион Ca^{2+} частично или полностью замещён на Cu^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} и др. Ниже перечислены лишь реакции, катализируемые кальциевыми разновидностями апатита, по составу аналогичными природным.

Дегидрирование и дегидратация. Кальциевый гидроксилapatит катализирует реакции дегидрирования и дегидратации спиртов, таких как этанол, бутанол и пропанол [109-114], а также переноса водорода от спиртов к кетонам, [110]. Каталитическая активность изменяется при отклонениях состава минерала от стехиометрии. Стехиометрический гидроксилapatит, имеющий отношение Ca/P равное 1.67, главным образом катализирует реакции дегидрирования, такие как синтез ацетальдегида из этанола. В то же время гидроксилapatит с дефицитом кальция, с отношением Ca/P близким к 1.50, катализирует реакции дегидратации, например, синтез этилена из этанола, [112,114]. К сожалению исследования, ориентированные на промышленные применения, все выполнены при температуре 250-500° С. В отсутствие экспериментальных данных о возможности синтеза в более мягких условиях, делать вывод о наличии активности дегидрогеназы или дегидрогеназы у апатита было бы преждевременно, но скорее всего такая активность действительно имеет место.

Трансфосфорилирование и фосфорилирование. В 1962 г. авторами [115] было обнаружено, что кальциевый (а также и стронциевый) гидроксилapatит обладает активностью киназы в водной среде при физиологических значениях температуры и pH. В

исследованной ими реакции конечный фосфат отщеплялся от молекулы АТФ или АДФ и соединялся с фосфатом на поверхности апатита с образованием пирофосфата (PPi). Реакция протекает лишь при наличии как апатита, так и PPi. Образующийся PPi адсорбируется поверхностью минерала, причём механизм адсорбции полученного таким образом PPi принципиально отличается от механизма адсорбции PPi апатитом из раствора. PPi, адсорбированный апатитом из водного раствора, легко гидролизует в присутствии щелочной фосфатазы, тогда как PPi, образованный за счёт отщепления фосфата от нуклеотидов, мог быть гидролизован фосфатазой лишь после растворения минерала.

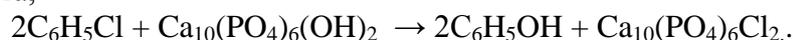
Через восемь лет после обнаружения киназной активности апатита, в работах [116,117] было показано, что реакция, исследованная в [115] может быть обращена. Согласно данным [116,117], PPi фосфорилирует аденозин до АМФ в присутствии гидроксилapatита. АМФ в этих же условиях фосфорилируется до АДФ и АТФ. Реакции протекают при повышенной температуре в безводных условиях. Авторы помещали взвесь гидроксилapatита в раствор, содержащий PPi и нуклеотиды (или нуклеозиды). Затем образцы замораживались и, после лиофилизации, выдерживались при 95° С в течение нескольких суток. Для протекания этих реакций также необходимо одновременное присутствие и апатита, и PPi.

Возможность фосфорилирования нуклеозидов апатитом в отсутствие PPi была продемонстрирована в работе [118]. Авторы выпаривали разбавленные растворы тимидина и уридина в присутствии апатита и оксалата аммония. Получены соответствующие нуклеозид-монофосфаты, а также неидентифицированные нуклеозид-полифосфаты со значительным выходом. В качестве катализаторов были использованы синтетический гидроксилapatит и природный фторапатит магматического происхождения. При использовании фторапатита выход нуклеотидов примерно вдвое выше.

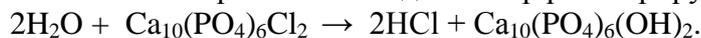
Конденсация аминокислот. Согласно [119], гидроксилapatит катализирует образование дипептидов из мономеров аминокислот. В своих опытах авторы выпаривали водные растворы аминокислот: L-α-аланина, глицина, глутаминовой и аспартановой кислот в присутствии взвеси гидроксилapatита и затем выдерживали образцы при 110-190° С. Показано образование соответствующих дипептидов. Наибольший их выход наблюдается при 130° С. В отсутствие апатита признаков конденсации аминокислот не обнаруживается.

Синтез рибоз. Авторы работ [120,121] утверждают, что гидроксилapatит катализирует синтез D-рибоз из аммиака, метана и воды. В качестве источника этих сведений в обеих статьях приведена ссылка на работу [122], опубликованную в 1978 г. в реферируемом издании, посвящённом переработке целлюлозы. Ни статья, ни даже реферат её не могут быть получены через интернет, поэтому иных сведений об упоминаемой реакции в моём распоряжении пока нет.

Гидролиз хлорбензола. Кальциевый гидроксилapatит используется в промышленности для получения фенола в т.н. *Raschig-Hooker Process*, [123]. На второй стадии процесса хлорбензол реагирует с гидроксилapatитом при 375-450° С с образованием фенола и хлорапатита,



Подаваемый вместе с хлорбензолом водяной пар регенирует гидроксилapatит,



Не исключено, что дезоксирибозы могут быть получены каталитическим восстановлением рибоз на хлорапатите в процессе, напоминающем *Raschig-Hooker Process*, протекающем с последовательной заменой –ОН на –Cl и –Cl на –H.

5.4. Роль апатита в возникновении ДНК.

Принято считать, что в ходе эволюции ДНК стала носителем наследственной информации, поскольку лучше подходила на эту роль ввиду её большей (по сравнению с РНК) химической устойчивости. В современных организмах ДНК всегда образуется конденсацией дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), всегда получаемых из рибонуклеозидтрифосфатов (rNTP) при участии двух типов ферментов – рибонуклеотидредуктаз и тимидилсинтаз. Рибонуклеотидредуктазы (RNR) катализируют превращение rNTP в dNTP, а тимидилсинтазы осуществляют метилирование dUMP с образованием dTMP.

Целесообразность замены урацила на тимидин связывают с тем, что в клетках цитидин спонтанно утрачивает аминогруппу, превращаясь в урацил. Поэтому замена урацила тимидином облегчает выявление и устранение повреждений в ДНК, [694]. Замена РНК на ДНК, вероятно, осуществлялась в два этапа, и замена рибонуклеотидов дезоксирибонуклеотидами предшествовала замене урацила тимидином, [239]. Бактериофаги, ДНК которых содержит урацил, судя по всему, возникли после возникновения ДНК, но прежде, чем урацил был заменён на тимин, [695]. Причину замены рибонуклеотидов дезоксирибонуклеотидами видят в более высокой устойчивости последних к гидролизу. Ниже предложено альтернативное объяснение этой замены, в котором устойчивость к гидролизу выступает лишь одним из слагаемых эволюционного успеха ДНК.

Напомним, репликация молекулы РНК стемпингом апатитовой основы включает в себя следующие стадии: (1) укоренение одноцепочечной РНК-матрицы в основе; (2) хемосорбция мононуклеотидов основой с образованием уотсон-криковских пар; (3) соединение нуклеотидов фосфодиэфирными связями; (4) десорбция двухцепочечного полинуклеотида; (5) денатурация полученной двухцепочечной РНК с разъединением кодируемой и кодирующей последовательностей. Протекание указанных стадий, вероятно, регулировалось рибозимами, специально выработанными в процессе молекулярной эволюции. Данная схема включает в себе два встроенных изъяна, несомненно, служивших источником трудностей при осуществлении репликации. Первое затруднение в том, что число реплик, получаемых за один цикл репликации, неизбежно равнялось числу матриц. Матрица и её реплика обладали равным средством к поверхности минерала-основы, и потому отделение реплики от основы не могло быть осуществлено без отделения матрицы. Тем самым, отсутствовала возможность снятия большого числа реплик с одной матрицы. Кроме того, рибозимы, регулирующие стемпинг, будучи молекулами РНК, сами обладали определённым средством к поверхности минерала, и это не могло не осложнить их работу.

Оба затруднения могут быть устранены, если нуклеотиды кодирующей последовательности заменить молекулами, практически не отличающимися от них по своим свойствам (геометрические параметры, гомология водородных связей в уотсон-криковских парах, участие в стэкинге), но обладающими более высоким средством к апатиту. ДНК, очевидно, обладает всем набором желаемых свойств. В частности, ДНК обладает существенно более высоким средством к апатиту, нежели РНК, – факт хорошо известный из практики апатитовой хроматографии (см. далее, раздел 6.1). Последнее обстоятельство позволяет подобрать диапазон условий, в которых ДНК фиксирована в основе, а РНК – нет. В этих условиях рибозимы могли катализировать реакции на поверхности апатита, не связываясь с ней ионными связями. И при этом появилась возможность для более рациональной организации жизненного цикла: в случае необходимости с одной ДНК-матрицы можно было снять произвольное число РНК-реплик.

Известный факт большей устойчивости ДНК по отношению к гидролизу, обеспечивающий большую стабильность этого полинуклеотида в водной среде, важный

для современных организмов, тоже мог способствовать выбору ДНК в качестве хранилища наследственной информации. Например, после десорбции одноцепочечная молекула ДНК должна была иметь лучшие (по сравнению с аналогичной РНК) шансы достичь нового кристалла апатита и связаться с ним.

Высокое сродство ДНК к апатиту, несомненно делает её более подходящим кандидатом на роль носителя наследственной информации, нежели РНК, в условиях, когда жизненный цикл крайне примитивен, весь осуществляется на поверхности апатитового кристалла. Однако для замены РНК на ДНК необходимо осуществить восстановление rNTP до dNTP, что весьма непросто. Реакция эта уникальна в том смысле, что в современных организмах её катализ осуществляется при участии свободного радикала – тирозила, содержащегося в активном центре RNR, [696]. Высказывались сомнения в способности рибозимов регулировать реакции, протекающие с участием свободного радикала, [697]. Тем самым, факт замены РНК на ДНК выглядит парадоксальным и необъяснимым.

Парадоксальность замены РНК на ДНК снимается, если предположить, что реакция восстановления rNTP до dNTP осуществлялась при участии каталитической активности апатита. Но в таком случае активные центры современных рибонуклеотидредуктаз должны удерживать в себе элементы сходства с со структурой поверхности апатита. Ниже делается попытка обнаружения такого сходства.

Особенности строения рибонуклеотидредуктаз. Ферменты RNR, катализирующие превращение rNTP в dNTP, у различных организмов отличаются между собой кофакторами и уровнем фосфорилирования субстратов [124]. По типу кофактора изученные к настоящему времени RNR разделяют на три класса. В RNR типа I в качестве кофактора выступают два атома негемового железа (т.н. $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ centre), в RNR типа II используется 5'-дезокси аденозинкобаламин, а для функционирования RNR типа III в качестве кофактора требуется S-аденозилметионин, [125]. В каждом из трёх типов RNR обнаруживаются дальнейшие вариации. Например, выделяют подкласс RNR Ib, в которых на месте $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ centre присутствует $\text{Mn}^{\text{III}}\text{-O-Mn}^{\text{III}}$ centre и подкласс Ic с $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ centre. [126]

При всех различиях ферментов, сходство строения отдельных элементов, выявленное при сопоставлении их кристаллических структур, указывает на происхождение всех трёх типов RNR от единого общего предка, [127]. Молекула RNR типа I состоит из двух неидентичных субъединиц: R1 и R2, при этом кофактор $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ содержится в R2. (RNR других типов имеют сходное, но несколько отличное строение). В активном ферменте субъединицы R1 и R2 состыкованы, при этом тирозил (радикал) примыкает к центру $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ и стабилизируется им, [696].

При сопоставлении генов, кодирующих R1 и R2 в различных организмах, обнаруживаются консервативные последовательности. В частности в R2 обнаружена исключительно консервативная последовательность из 17 аминокислотных остатков, идентичная, по крайней мере, в десяти организмах: (Trp 48, Glu 115, His 118, Glu 204, Asp 237, Glu 238; His 241), (Tyr 122; Phe 208, Ser211, Phe 212; Ile 234), (Asp 59, Arg 236, Glu 350, Tyr 356), (Pro 331). (Нумерация дана как в геноме *E.coli*; аминокислотные остатки заключены в скобки согласно выполняемым ими функциям; в субъединице R1 имеется своя консервативная последовательность аминокислотных остатков, не содержащая ни одной карбоксильной группы. [128]).

Несмотря на то, что аминокислотные остатки указанной последовательности не следуют подряд, один за другим, они непосредственно контактируют в молекуле R2, составляя ближайшее окружение кофактора $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$. Как можно видеть, шесть из указанных 17-ти консервативных элементов содержат карбоксильные группы: Glu 115, Glu 204, Asp 237, Glu 238, Asp 59 и Glu 350. В разделе 6.3.7, посвящённом адсорбции пептидов апатитом, показано, что протеины с большим количеством карбоксильных групп

обнаруживают повышенное сродство к апатиту, в особенности к граням гексагональной призмы. Не исключено, что консервативная 17-элементная последовательность субъединицы R2, вместе с кофактором $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$, представляет собой реликт более древнего молекулярного устройства, некогда используемого примитивными организмами для получения дезоксирибонуклеотидов из нуклеотидов. Карбоксильными группами кофактор мог прикрепляться к поверхности кристалла.

Возможна и другая интерпретация изложенных здесь данных, также связывающая кофактор $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ с апатитом. В разделе 9.1.2 настоящей работы обсуждается класс ферментов, катализирующих реакции переноса фосфата, содержащих два близкорасположенных катиона металла валентности 2+ или 3+, малого ионного радиуса. Катионы удерживаются на близком расстоянии при помощи карбоксильных групп. Сопоставление активных центров, выполненное в указанном разделе, приводит к выводу, что в активном положении, когда фосфатная группа размещена между двумя катионами, активный центр фермента есть ни что иное, как фрагмент структуры апатита. Не исключено, что изначально кофактор $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ тоже представлял собой два катиона, занимавших соседние позиции кристаллической структуры на грани кристалла апатита. Тирозил мог контактировать и взаимодействовать с таким центром, подобно тому, как это имеет место в современных ферментах RNR.

5.4.1. Жизненные циклы предков бактерий и предков архей.

Возникновение ДНК должно было привести к появлению группы организмов, использующих эти биополимеры в качестве носителей наследственной информации. Возникает, тем самым, два вопроса: (1) с какой группой современных организмов можно соотнести эту древнюю группу? (2) Как мог быть организован их жизненный цикл?

Возникновение ДНК, вероятно, должно было привести к разделению эволюционирующих полинуклеотидов на два класса. Жизненный цикл одних, как и прежде, основывался на репликации РНК, а осуществление жизненного цикла других протекало с участием ДНК. Существа (пока не ясно, клеточные или доклеточные), чей жизненный цикл включал в себя синтез и полимеризацию ДНК, в ходе последующей эволюции должны были выработать ферменты, катализирующие соответствующие реакции уже без участия апатита. Поэтому филогенетический анализ белков, участвующих в синтезе и полимеризации ДНК, может быть использован для идентификации группы организмов, чьи предки были «создателями» ДНК. Типы катализируемых реакций полимеризации при этом могут быть использованы для идентификации их жизненного цикла.

Данные об эволюции тимидилсинтаз не могут быть использованы для установления организмов, в которых эти ферменты возникли, вследствие феномена горизонтального переноса генов, имеющего для этой группы ферментов чрезвычайно широкое распространение, [698]. Точная филогенетическая реконструкция эволюции ферментов RNR тоже затруднена вследствие феномена горизонтального переноса генов. Тем не менее, авторы [270], детально исследовавшие вопрос, наиболее вероятным полагают возникновение всех трёх типов RNR в домене бактерий. Вероятно, предки бактерий и являются «создателями» ДНК. Тем самым, можно предположить, что с возникновением ДНК жизнь разделилась на два домена. Существа, использовавшие ДНК в качестве носителя наследственной информации, дали начало бактериям. Мы будем называть их *предками бактерий*.

Если РНК была единственным типом полинуклеотидов у предков архей, их жизненный цикл должен был основываться на репликации РНК. Жизненный цикл предков бактерий мог быть основан на репликации ДНК или на чередовании транскрипции с обратной транскрипцией. Первое предположение не согласуется с выводами авторов филогенетического исследования [223], согласно которым белки, необходимые для синтеза компонентов ДНК, возникли задолго до появления репликации ДНК. Тем самым,

мы приходим к выводу, что воспроизводство предков бактерий основывалось на чередовании транскрипции и обратной транскрипции.

Далее, если жизненный цикл предков бактерий действительно основывался на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, тогда и ферменты, катализирующие соответствующие реакции полимеризации – обратная транскриптаза (*reverse transcriptase*, RT) и транскриптаза (RNAP) – должны были возникнуть в домене бактерий, точнее их предков. Эти предсказания можно попытаться проверить, используя филогенетические данные.

Соотнесение RT с какой-либо группой организмов затруднено тем обстоятельством, что этот фермент не требуется для воспроизведения современных клеток. RT обнаруживается в подвижных генетических элементах и вирусах, а также в большом количестве молекулярных структур неясной природы. Теломераза эукариотов – это пока единственный пример RT, непосредственно участвующей в жизнедеятельности клетки.

Филогенетический анализ данных о RT, ассоциируемых с мобильными генетическими элементами архей, свидетельствует об их бактериальном происхождении, [699]. Совместное филогенетическое древо RT бактерий и эукариотов может быть укоренено в бактериях, [700], однако не столь надёжно. Происхождение RT эукариотов и бактерий от общего предка сомнению не подвергается, но на основании одних лишь филогенетических данных надёжно установить, кто из них возник раньше, пока не представляется возможным. Анализ с более общих позиций, с привлечением молекулярно-биологических и структурных данных приводит к выводу о происхождении RT эукариотов от RT бактерий, [701].

О наличии обратной транскрипции у предков архей свидетельствует также факт необычайно широкого распространения генетических элементов, кодирующих собственную RT, в хромосомах бактерий. К числу генетических элементов, кодирующих собственную RT, относятся, например, ретроны (*retrons*), ретроплазмиды (*retroplasmids*) и кодирующие RT интроны группы II, однако в действительности их много больше. В недавнем филогенетическом исследовании [702] было показано существование 17 различных кодирующих RT типов генетических элементов, интегрированных в геном бактерий. Их функции, биологическое значение пока не выяснены. В археях гены кодирующие RT редки, [699]. С эукариотами ассоциируются содержащие RT ретротранспозоны (которые бывают двух типов), ретровирусы и параретровирусы (*hepadnaviruses* и *caulimoviruses*), теломераза, [703], недавно обнаруженные гены *rvt*, [704]. Вероятно, генетические элементы, кодирующие собственную RT, ранее, до появления полимераз, осуществляли обратную транскрипцию стемпингом хозяйского апатита. Они должны были обзавестись собственными генами, кодирующими RT, после упразднения стемпинга и появления *bona fide* полимераз. Тот факт, что большинство кодирующих RT генетических элементов ассоциируется именно с бактериями, тем самым, свидетельствует в пользу наличия обратной транскрипции у предков бактерий.

Далее, высказанный выше аргумент, что чередование предками бактерий транскрипции с обратной транскрипцией предполагает возникновение фермента транскриптазы (RNAP) в среде предков бактерий, к счастью, легко может быть проверен филогенетическими методами. Транскрипция, в отличие от обратной транскрипции, составляет неотъемлемый элемент воспроизводства современных организмов. Вероятно, этим обстоятельством была обеспечена преемственность используемых организмами транскриптаз, по крайней мере, тех из них, которые являются составными.

Известны два типа ферментов, катализирующих транскрипцию, т.н. составные РНК-полимеразы (*multisubunit RNA polymerases*), и РНК-полимеразы, не являющиеся составными (*single-subunit RNA polymerases*). Мы будем их здесь обозначать, соответственно, как *msRNAP* и *ssRNAP*.

Транскрипция геномов всех клеток осуществляется ферментами *msRNAP*, однако геномы митохондрий в клетках большинства эукариотов (не всех) транскрибируются

посредством ssRNAP. Подобными же полимеразми транскрибируется геном хлоропластов (опять-таки не всех). Кроме того кодирующие ssRNAP гены обнаружены в некоторых бактериях и в бактериофагах T3 и T7, паразитирующих на γ -бактериях, [705].

Вопрос о происхождении ssRNAP сложен. Он составляет часть проблемы происхождения и эволюции полимераз, не являющихся составными. Полимераза ssRNAP обнаруживает гомологию с ДНК-полимеразами семейства pol I, [706]. Согласно выводам авторов [705], ssRNAP содержащаяся в митохондрии произошла от бактериофагов. Малая распространённость ssRNAP и тот факт, что в родственных митохондриям риккетсиях этот фермент не обнаруживается, наводит на мысль о более позднем возникновении ssRNAP.

Эволюционная история msRNAP понята много лучше, чем ssRNAP, вследствие повсеместного её распространения, обилия данных, а также вследствие каких-то особенностей эволюционных изменений, позволяющих уверенно укоренять ветви её филогенетического древа. На Рис 5-4 А показано единое филогенетическое древо msRNAP, построенное авторами [707] на основании данных о последовательностях нуклеотидов примерно в тысяче генов. Филогенетическое древо для RNAP бактерий показано отдельно на Рис 5-4 В, а аналогичное древо для эукариотов и архей на Рис 5-4 С. Топологическая структура древа ясно указывает на бактерий как на источник msRNAP. Ясно также, что эукариоты позаимствовали свои msRNAP у бактерий, а археи – у эукариотов.

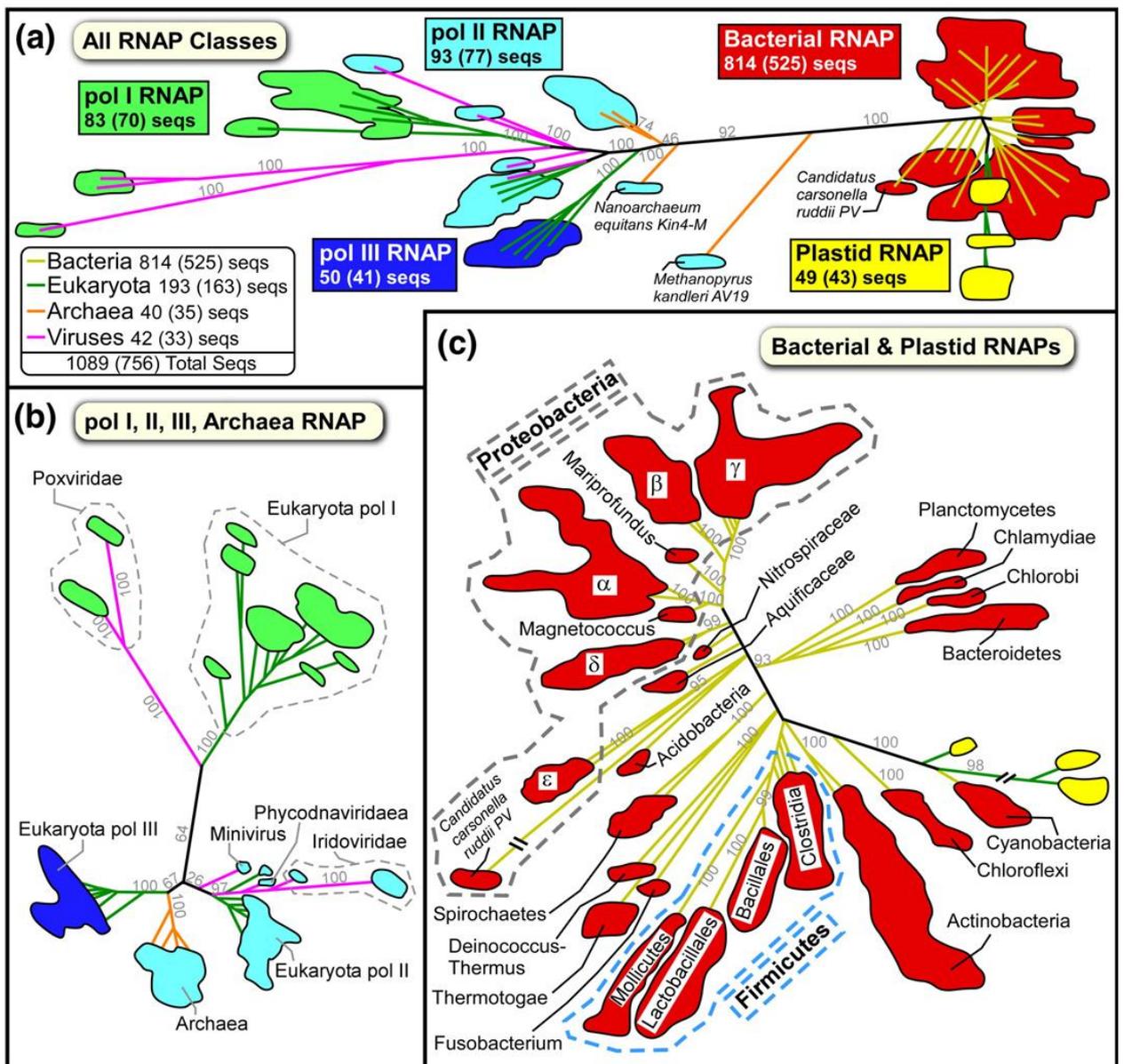


Рис 5-4. Филогенетический анализ составной РНК-полимеразы (RNAP): (А) Единое филогенетическое древо RNAP для всех трёх доменов жизни; (В) Филогенетическое древо RNAP архей и эукариотов; (С) Филогенетическое древо RNAP бактерий.

/Phylogenic analysis of the all-RNAP large-subunit MSA. The two all-RNAP large-subunit alignments were combined by species and the residue positions pruned to only keep the regions shared among all the sequences. The phylogenic trees were calculated using PhyML v3.027 and analyzed using TreeDyn28. Because of the large number of sequences, only the boundaries for each group of leaves are shown colored by RNAP class: bRNAP (red), pRNAP (yellow), eRNAP I (green), eRNAP II (blue), and eRNAP III (cyan). The branches for each leaf region are colored by taxonomy: bacteria (yellow), eukaryota (green), archaea (orange), and viruses (magenta). Because of their diversity, the proteobacteria (gray dashed region) and firmicutes (light blue dashed region) taxonomy subdivisions have been individually labeled. Selected branch support values are indicated in light gray. (a) All RNAP Classes tree. For each class, the total number of complete β/β' homolog sequences is shown. The second number in parentheses is the number of sequences nonredundant within the shared regions. (b) eRNAP-like RNAPs (eRNAP I, II, III, aRNAP, vRNAPs). (c) Bacterial and plastid RNAPs. / Из работы [707]

Вывод о том, что, по крайней мере, два участвующих в синтезе ДНК или использующих ДНК фермента – рибонуклеотидредуктаза и msRNAP – восходят к бактериям, согласуется с представлением о предках бактерий как о существах, «создавших» ДНК, чей жизненный цикл был основан на чередовании транскрипции и

обратной транскрипции. В этой связи интересно отметить одну особенность процесса трансформации. Трансформацией называется процесс, в котором бактерия поглощает из внешней среды и встраивает в собственный геном молекулу ДНК, выделенную другой бактерией. Любопытная особенность естественной трансформации в том, что прежде чем проникнуть в клетку-реципиент двухцепочечная молекула ДНК с внешней стороны прикрепляется к клеточной стенке. Затем одна из двух цепочек разрушается, и внутрь клетки, в итоге, проникает лишь одноцепочечная ДНК, [708]. Необходимость разрушения одной из двух комплементарных цепочек наводит на мысль, что описываемый процесс (биологическое значение которого обсуждается далее, в разделе 5.10) мог быть унаследован от предков бактерий, чередующих транскрипцию с обратной транскрипцией, в те времена, когда двухцепочечной ДНК в природе ещё не существовало.

Идентификация бактерий как группы организмов, чьи предки чередовали транскрипцию с обратной транскрипцией, в соединении с тем фактом, что эукариоты возникли позднее бактерий и архей (см. далее, раздел 5.10) позволяет идентифицировать архей как группу организмов, чьи предки реплицировали РНК. Последнее означает, что фермент РНК-репликаза (РНК-зависимая РНК полимераз) должен был возникнуть у предков архей. К сожалению, проверить данное соотношение не представляется возможным. Происхождение этого фермента не может пока быть соотнесено с какой-либо конкретной группой организмов, [709].

В последующем изложении, при обсуждении проблемы происхождения эукариотов в разделе 5.11, нам понадобится тот факт, что все известные РТ являются гомологами. Причём соответствующие последовательности нуклеотидов и особенности структуры обнаруживают сходство с РНК-репликазой, свидетельствующее о единстве происхождения этих групп ферментов, [710].

5.5. Роль апатита и стемпинга в возникновении трансляции.

Трансляцией называют синтез белка с матрицы мРНК (матричной РНК). Молекула мРНК представляет собой реплику гена – молекулы ДНК, входящую в состав хромосомы. Расшифровка генетической информации, закодированной в мРНК, и синтез соответствующей полипептидной цепи осуществляется рибосомой. Аминокислоты, из которых синтезируются белки, доставляются к рибосомам молекулами тРНК (транспортной РНК). В настоящем разделе показано, что трансляция могла возникнуть как вспомогательное приспособление, облегчавшее осуществление репликации РНК стемпингом апатита при повышенных давлениях. На основе предложенной модели затем делается попытка описать основные этапы возникновения, становления и эволюции генетического кода.

5.5.1. Перемещение биологической активности в область высоких давлений.

Выше (раздел 5.1) указывалось, что скорость, с которой молекула полинуклеотида реплицирует себя, должна была стать одним из решающих факторов отбора на ранних этапах молекулярной эволюции. Одним из факторов, ограничивающих скорость репликации, осуществляемой стемпингом, является скорость реакции соединения нуклеотидов удлиняемой цепочки фосфодиэфирными связями. Скорость этой реакции может быть существенно увеличена, если стемпинг осуществляется в условиях, где фосфодиэфирные связи обладают большей термодинамической стабильностью (имеют меньшее значение удельной свободной энергии Гиббса).

Вопросы термодинамики фосфодиэфирных связей детально обсуждаются в главе 10 настоящей работы. Выполненный там анализ имеющихся экспериментальных данных приводит к выводу, что гидростатическое давление является параметром, меняя который

можно регулировать степень стабильности фосфодиэфирных связей (по отношению к гидролизу и к переэтерификации). Свободная энергия гидролиза связи CpG, например, близкая к нулю при атмосферном давлении, уменьшается на 2.5 kJ при увеличении давления на 1 kb. Тем самым, при увеличении давления до 1-2 kbar процесс стемпинга должен существенно ускориться.

Давление на дне современного океана не превосходит 600 bar, и в архее океан, вероятно, не был глубже, чем сейчас. Тем не менее, области давления до 2 kbar (соответствующие глубине воды до 20 km) могли быть доступны в трещинах и разломах дна. Дно современного океана, как хорошо известно, разбито многочисленными трещинами и разломами тектонической природы, простирающимися в глубину на километры. В них проникает вода, а геотермальный градиент поддерживает её конвективную циркуляцию. Дно океана в архее, скорее всего, было разбито более глубокими трещинами, постоянно возникавшими вследствие столкновений планеты с астероидами. У нас есть, тем самым, основания предположить, что, возникнув вблизи поверхности, синтез нуклеотидов и репликация РНК затем переместились в область более высоких давлений, порядка 1-2 kbar, где бóльшая стабильность фосфодиэфирной связи обеспечивала бóльшую скорость синтеза. При повышении давления многие биологические молекулы обнаруживают неожиданные свойства.

Изменения свойств рибозимов при повышенных давлениях. В контексте обсуждаемого вопроса о происхождении трансляции достоин упоминания тот факт, что при высоких давлениях природная тРНК становится рибозимом. Согласно данным [711], при давлении равном 10 kbar тРНК (использовалась yeast tRNA^{Phe}) катализирует реакции Дильса-Альдера (Diels-Alder cycloaddition). При атмосферном давлении эта способность утрачивается.

Наличие у тРНК каталитической активности при 10 kbar, утрачиваемой при атмосферном давлении, может быть объяснено, если предположить, что до возникновения трансляции эта молекула представляла собой рибозим, функционирующий при повышенных давлениях. Для осуществления катализа молекула рибозима должна принять специальную пространственную конфигурацию. Ранее эта конфигурация принималась молекулой спонтанно при условиях умеренно-высоких давлений, порядка 1-2 kbar. Затем молекула тРНК стала одним из участников трансляции, её каталитические функции при этом не использовались. Вследствие изменений, накопившихся в ходе последующей эволюции, молекула утратила способность принимать каталитически-активную конфигурацию при повышенных давлениях, однако давления, ещё более высокие, эту способность ей возвращают. Поэтому современная тРНК принимает конфигурацию, обеспечивающую наличие каталитической активности, лишь при давлениях порядка 10 kbar (каких на дне океана, разумеется, быть не могло ни в архее, ни во все последующие времена).

Высокие давления сообщают молекуле тРНК ещё одно свойство, знаменательное в контексте настоящего раздела. Помимо каталитической активности, при высоких давлениях тРНК приобретает способность самопроизвольно связываться с аминокислотой. Напомним, в современных организмах функция тРНК заключается в транспорте аминокислот к месту синтеза белка. Каждой аминокислоте соответствует своя тРНК. Аминокислота ковалентно присоединяется к 3'- или 2'-концу молекулы тРНК с помощью специфичного для каждого типа тРНК фермента аминокил-тРНК-синтетазы. Реакция эта именуется аминокилированием. Соответствие между аминокислотой и её тРНК устанавливается посредством т.н. антикодона – участка тРНК, состоящего из трёх нуклеотидов, соединяющегося с комплементарным ему участком мРНК (кодоном).

При физиологических условиях для присоединения аминокислоты к тРНК необходимо присутствие фермента аминокил-тРНК-синтетазы и АТФ. По всей видимости, ковалентная связь аминокислоты с тРНК не является термодинамически стабильной,

поэтому аминоацилирование происходит с затратой энергии, поставляемой АТФ. О нестабильности связи тРНК с аминокислотой говорит также тот факт, что интроны группы I катализируют реакцию *обратную* аминоацилированию. Весьма знаменательно, что при высоких давлениях эта связь обретает термодинамическую стабильность.

При давлении равном 6 kbar, согласно данным [712], природная тРНК спонтанно соединяется с соответствующей аминокислотой, в отсутствие и аминоацил-тРНК-синтетазы, и АТФ. В опытах, выполненных авторами [712], tRNA^{Met} и tRNA^{Phe} соединялись, соответственно, с метионином и фенилаланином. Дальнейшее повышение давления (до 8 kbar) приводит к уменьшению выхода реакции. Обе реакции обнаруживают специфичность: выход реакции аминоацилирования tRNA^{Met} и tRNA^{Phe} с серином в аналогичных условиях был пренебрежимо мал. Позднее в работе [713] было показано, что спонтанно образующееся при высоких давлениях соединение аминокислоты с тРНК полностью аналогично природной аминоацил-тРНК, в частности оно может быть использовано рибосомой для синтеза полипептидов.

Основное допущение. Излагаемая ниже модель возникновения трансляции базируется на одном допущении о природе ковалентной связи, соединяющей тРНК с аминокислотой. Ввиду стабильности аминоацил-тРНК при высоких давлениях и отсутствия стабильности при атмосферном давлении, представляется разумным предположить, что в некотором диапазоне давлений имеет место ограниченная стабильность аминоацил-тРНК, утрачиваемая после того, как аминокислота соединяется с цепью полипептида посредством пептидной связи. Ситуация, когда небольшая молекула, способная образовывать несколько химических связей, должна разорвать одну из связей для образования другой, не составляет чего-либо необычного.

Активности апатита. Рибозимы, функционировавшие на поверхности апатита на ранних этапах молекулярной эволюции, вероятно, в той или иной мере использовали собственные каталитические и сорбционные активности кальциевого апатита. В силу счастливого стечения обстоятельств, многие из этих активностей хорошо изучены. В предлагаемой модели возникновения трансляции задействованы две такие активности. Первая состоит в способности апатита катализировать образование пептидной связи (обсуждалась ранее, раздел 5.3.2). Вторая заключается в способности апатита адсорбировать аминокислоты. Вопросы, связанные с сорбционной активностью апатита обсуждаются в главе 6. Здесь достаточно будет упоминания работы [378], согласно результатам которой все протеиногенные аминокислоты кроме оксопролина в той или иной степени обнаруживают сродство к поверхности апатита.

Физико-химические предпосылки возникновения трансляции. Предположим, стемпинг кристаллов апатита на заре жизни осуществлялось в присутствии аминокислот, содержащихся в исходном резервуаре органических молекул. Аминокислоты адсорбировались апатитовыми кристаллами, на которых осуществлялась репликация молекул РНК (посредством стемпинга). Присутствие аминокислот на поверхности кристаллов не должно было создавать серьёзных затруднений в области низких давлений, где спонтанное аминоацилирование невозможно. Предположим теперь, что жизнедеятельность молекул РНК, возникшая в области низких давлений, перенеслась в область давлений более высоких, скажем порядка 1-2 kbar, где фосфодизфирная связь является более стабильной и потому репликация может быть осуществлена быстрее и проще.

После перемещения биологической активности в более глубокие области океана, даже в самых глубоких расщелинах его дна, гидростатическое давление по-прежнему не достигало тех значений (порядка 6 kbar), когда РНК начинает спонтанно соединяться с аминокислотами, как в экспериментах авторов [712]. Однако связь РНК с аминокислотой

в этих условиях приобрела определённую термодинамическую стабильность, тем самым аминокислоты стали возможным при наличии подходящего катализатора.

Выше, в разделе 5.1.2, высказывалось предположение, что интроны группы I катализировали образование фосфодиэфирной связи при стемпинге, входя в симбиотические взаимоотношения с реплицирующимися молекулами РНК. Там же упоминалась и способность этого рибозима катализировать реакцию, обратную аминокислотилрованию. В условиях повышенных давлений, когда связь РНК с аминокислотой становится термодинамически стабильной, интрон группы I должен катализировать прямую реакцию – аминокислотилрование. Вероятно, вследствие присутствия интрона группы I или другого рибозима, способного катализировать аминокислотилрование, некоторые из рибозимов, функционировавших на поверхности апатита, соединялись с адсорбированными минералом аминокислотами, и это осложняло их работу. Тем не менее, преимущества, создаваемые функционированием в области повышенных давлений, оказались достаточно велики для того, чтобы не покидать областей высокого давления, но ввести специальное приспособление, отделяющее аминокислоты от рибозимов.

Термодинамические предпосылки для создания молекулярного приспособления, отделяющего аминокислоты от рибозимов, имеются в области умеренно высоких давлений, где (согласно сделанному допущению) имеет место ограниченная стабильность аминокислотил-тРНК, когда связь РНК с аминокислотой оказывается нестабильной при связывании этой аминокислоты с другой посредством пептидной связи. Выше уже упоминалось, что, согласно экспериментальным данным, апатит катализирует образование пептидной связи. Эта его способность, вероятно, была усилена посредством рибозимов. Для каталитического разрыва связи РНК и аминокислоты мог быть использован всё тот же интрон группы I.

5.5.2. Трансляция, как механизм отделения аминокислот от рибозимов.

Предположим, функционирование каких-то рибозимов осложнялось присоединением аминокислот к их 2'-или 3'-концам. Предположим, молекулы функционировали на поверхности апатитового кристалла, используемого в качестве основы. Допустим, на поверхности кристалла имелась укоренённая в него молекула РНК, предназначенная для репликации стемпингом, и случайным образом адсорбированные молекулы аминокислот. Устройство для отделения аминокислот, случайным образом присоединившимся к рибозимам, могло действовать следующим образом: (1) присоединение аминокислоты к 2'-или 3'-концу молекулы рибозима (предшественника тРНК) меняло его конформацию. (2) Изменение конформации рибозима влекло за собой встраивание в него интрона группы I посредством обратного сплайсинга. (3) Затем небольшой участок РНК (прообраз антикодона), вблизи того места, где внедрился интрон, встраивал свои фосфатные группы в основу и образовывал уотсон-криковские пары с одноцепочечной молекулой РНК, укоренённой в основу для стемпинга. (4) После этого соединённая с рибозимом аминокислота присоединялась пептидной связью с аминокислотой, адсорбированной апатитом. Образование пептидной связи катализировалось апатитом. (5) Образование пептидной связи служило сигналом для отсоединения интрона посредством аутосплайсинга. (6) Отсоединившийся интрон отсекал аминокислоту от рибозима. (7) Утративший аминокислоту и интрон рибозим испытывал десорбцию и переходил в раствор.

Отметим, все стадии описанного выше процесса могли возникнуть как адаптации молекулярных приспособлений, выработанных для эффективного осуществления стемпинга. Адсорбция и десорбция нуклеотидов может быть осуществлена небольшими изменениями концентрации Ca^{2+} и (или) $(\text{PO}_4)^{3-}$, см далее, глава 6. Получение вариантов интрона группы I, способных к аутосплайсингу и обратному сплайсингу в ответ на определённые изменения в конформации контактирующей с ним молекулы РНК

представляется вполне осуществимым в свете того, что сейчас известно о возможностях рибозимов. Способность интрона группы I катализировать отделение аминокислоты от РНК как и способность апатита катализировать образование пептидной связи проверены экспериментально. Отчасти произвольным остаётся наше допущение о наличии диапазона давлений, в котором связь аминокислоты с РНК утрачивает термодинамическую стабильность в результате образования ею пептидной связи. Допущение это несложно проверить в экспериментах.

5.5.3. Свидетельства участия интронов группы I в трансляции.

Помимо способности интрона группы I катализировать реакцию обратную аминоацилированию, ряд фактов о связи этих интронов с тРНК, с рибосомной РНК (рРНК), с некоторыми тирозил-тРНК-синтетазами, а также способность его катализировать циклизацию собственной молекулы служат дополнительными свидетельствами в поддержку предлагаемой выше модели возникновения трансляции.

Циклизация молекул интронов. Аргумент в поддержку предлагаемой схемы возникновения трансляции может быть усмотрен в способности интронов группы I и группы II катализировать реакцию, в которой молекула РНК лигирует собственные концы, замыкаясь в кольцо.

Напомним, интрон группы I катализирует реакцию, обратную аминоацилированию, а также реакции аутосплайсинга и обратного сплайсинга. Катализ всех реакций осуществляется без использования внешних источников энергии. При аутосплайсинге интрон высвобождается в виде линейной молекулы, лигируя (срашивая) образовавшиеся концы (т.н. экзоны). В 1983 г., при исследовании реакций, катализируемых интроном группы I, была обнаружена реакция циклизации, сходная с аутосплайсингом, при которой интрон лигирует собственные концы с образованием кольцевой молекулы. В результате реакции образуется полная (без выпадений) кольцевая молекула интрона и два нелигированных (расчленённых) экзона, [714]. Согласно данным [715], для осуществления реакции циклизации интрон должен принять определённую конформацию, отличную от конформации, в которой осуществляется аутосплайсинг. Реакция циклизации протекает лишь *in vitro*, предположительно потому что *in vivo* возникновение соответствующей конформации специфически подавлено какими-то агентами. Способность к образованию циклической молекулы является общим свойством интронов группы I, во всяком случае, всех интронов группы I содержащихся в ядре. Биологическое значение этой реакции, расчленяющей молекулы РНК, оставалось загадкой.

Подобно интронам группы I, интроны группы II тоже обнаруживают способность лигировать собственные концы с образованием кольцевой молекулы, [716]. Биологическое значение этой реакции тоже выяснено не было.

Каталитические активности, общие для интронов группы I и группы II, таким образом, сводятся к способности внедриться в молекулу РНК путём обратного сплайсинга, покинуть молекулу путём аутосплайсинга и лигировать собственные концы с образованием кольцевой молекулы. Создаётся впечатление, что оба интрона на ранних этапах молекулярной эволюции представляли собой рибозимы, функционировавшие на поверхности апатитовых кристаллов, сорбирующих молекулы аминокислот. Способность обоих интронов к образованию кольцевой молекулы могла возникнуть как адаптация к условиям высокой концентрации аминокислот, спонтанно образующих ковалентные связи с 2'- или 3'- концом молекулы РНК. Наличие способности внедриться в молекулу РНК путём обратного сплайсинга и покинуть её посредством аутосплайсинга, видимо, указывает, что молекулы интронов группы I и группы II ранее курсировали между молекулами РНК.

Общность происхождения интронов из генов тРНК архей, эукариотов и бактерий. В бактериях интроны группы I встречаются главным образом в генах, кодирующих тРНК. Интронами прерываются гены четырёх транспортных РНК бактерий (tRNA^{Arg}_{CCU}, tRNA^{Ile}_{CAU}, tRNA^{Leu}_{UAA} и tRNA^{Met}, [717]), причём всегда в последовательностях нуклеотидов, соответствующих петле, содержащей антикодон (за исключением интегрированных генов фагов), [718]. Примечательно, что интронами также прерываются гены тРНК эукариотов и архей, и тоже в петле, содержащей антикодон. В тРНК эукариотов интроны всегда отстоят на один нуклеотид от 3'-конца антикодона. У архей интроны, как правило, обнаруживаются в аналогичной позиции, отстоящими на один нуклеотид от 3'-конца антикодона, но бывает и другая локализация, [719].

Интроны, прерывающие гены тРНК архей и эукариотов, уникальны в том смысле, что нигде больше не обнаруживаются. В отличие от интронов в тРНК бактерий, интроны тРНК архей и эукариотов не являются рибозимами и не способны к аутосплайсингу. Удаление их из пре-тРНК осуществляется специализированными белковыми ферментами. При этом механизм сплайсинга у эукариотов обнаруживает некоторые принципиальные отличия от сплайсинга у архей. На этом основании, а также ввиду отсутствия сходства между интронами, до 1998 г. указанные два типа интронов считались никак не связанными между собой. Затем выяснилось, что тРНК-эндонуклеаза (один из белков, принимающих участие в сплайсинге интронов тРНК эукариотов) связана общностью происхождения с аналогичной тРНК-эндонуклеазой архей, [681]. Из этого был сделан вывод об общности происхождения интронов тРНК архей и эукариотов, ныне общепризнанный, [720].

Если принять изложенную выше схему возникновения трансляции, тогда представляется разумным считать все интроны в генах тРНК (включая тРНК архей и эукариотов) происходящими от интронов группы I. Различия между группами, очевидно, могли возникнуть вследствие различий в механизме сплайсинга. Бактериальный путь извлечения интронов – аутосплайсингом – предполагает удержание необходимой для этого каталитической активности интрона и сохранение его важнейших свойств в процессе эволюции. Для извлечения интронов ферментативным сплайсингом, практикуемым археями и унаследованным (с последующими изменениями) эукариотами, сохранения каталитической активности не требовалось, и потому интроны в тРНК архей и эукариотов изменились до неузнаваемости. Удержание каталитической активности интрона у бактерий может быть объяснено тем, что предки бактерий приобрели *bona fide* полимеразы намного позже предков архей. Интроны группы I были непосредственно задействованы в транскрипции и(или) обратной транскрипции, осуществляемой стемпингом в момент, предшествующих образованию предков эукариотов, тогда как предки архей к тому времени обзавелись РНК-репликазой и осуществляли репликацию РНК без помощи интронов (см раздел 5.10).

Связь интронов группы I с рибосомной РНК (рРНК). В ядерных геномах, а также в геномах органелл (митохондрии, пластиды) интроны группы I обычно рассекают гены рРНК, в бактериях эти интроны тоже могут быть локализованы в генах рРНК, но значительно реже, [717]. Локализация интронов в генах рРНК обнаруживает закономерности, указывающие на неслучайный характер их внедрения. Имеется дискретный набор возможных локализаций интронов группы I, которые прослеживаются для гомологичных рРНК филогенетически удалённых видов (таких как грибы, зелёные водоросли, красные водоросли), [790]. Сайты внедрения интронов представляют собой высококонсервативные участки рРНК. Помимо консерватизма, сайты внедрения интронов группы I отличает то обстоятельство, что они располагаются на поверхности рибосомы, т.е. в участках, которыми молекула рРНК может взаимодействовать с окружением. Более

того, сайты внедрения имеют определённые физиологические функции. Чаще всего интроны группы I обнаруживаются в сайте связывания рибосомы с тРНК, [791, 792].

Локализация сайтов внедрения интрона на поверхности молекулы наводит на мысль о возможности внедрения интрона в рРНК путём обратного сплайсинга. Обратный сплайсинг – это внедрение линейной молекулы в РНК с помощью реакции, обратной сплайсингу, Рис 5-5.

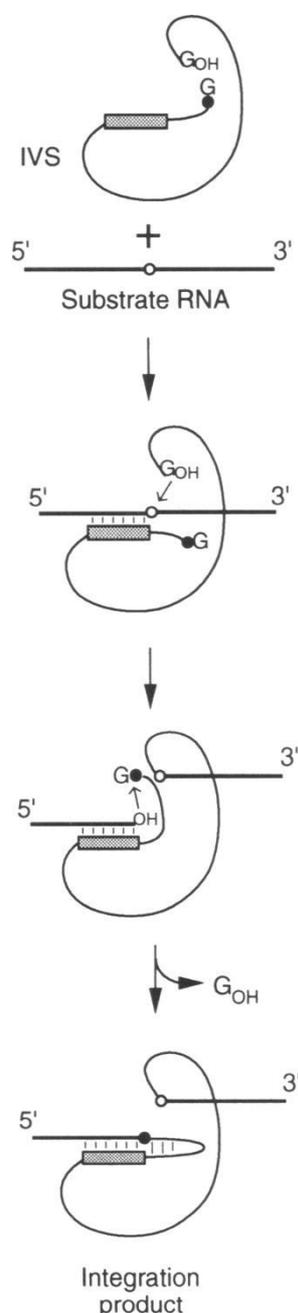


Рис 5-5. Механизм обратного сплайсинга интрона группы I. Реакция проходит через те же стадии, что и сплайсинг, но в противоположном направлении. Иницированию реакции предшествует распознавание последовательностью IGS интрона (заштрихованный прямоугольник) комплементарного ей участка сайта внедрения в молекуле РНК и спаривание этих участков путём образования уотсон-криковских пар. /Mechanism of group I reverse splicing. Base pairing of the substrate (ligated exon) RNA with the internal guide sequence (IGS, shaded rectangle) is followed by attack of the 3' terminal hydroxyl group of the IVS at the splice junction (open circle). In the second step, the 3' hydroxyl of the 5' exon reacts with the first phosphodiester bond of the intron (closed circle), displacing the 5' guanosine./ Из работы [792].

Внедрению интрона путём обратного сплайсинга предшествует этап распознавания сайта внедрения, в процессе которого участок РНК-субстрата на границе сайта внедрения спаривается с комплементарным ему участком интрона путём образования уотсон-криковских пар. В работе [792] исследована реакция обратного сплайсинга интрона группы I в большую субъединицу рРНК. В опытах был использован интрон из *Tetrahymena*, на Рис 5-5 обозначенный как IVS, а в качестве модели субстрата была взята *E. Coli* 23S rRNA. Выяснилось, что интрон внедряется в различные высококонсервативные участки рРНК, а чаще всего обнаруживается в сайте,

соответствующем положению интрона в гене рРНК *Tetrahymena*. Тем самым, сайты внедрения интрона в рРНК путём обратного сплайсинга либо совпадают с сайтом, в котором в гене рРНК присутствует интрон, либо обнаруживают сходство с таковыми сайтами.

Поскольку внедрению группы I путём обратного сплайсинга предшествует распознавание сайта внедрения, внедрение возможно лишь при наличии комплементарных участков на интроне группы I и на рРНК. Закономерный характер расположения таких участков на рРНК и локализация интронов группы I в соответствующих участках генов рРНК указывают на общее эволюционное прошлое интронов группы I и рибосомы.

Есть ещё одно свидетельство связи рРНК с интроном группы I – это белок тирозил-тРНК-синтетаза, катализирующий реакцию присоединения аминокислоты *Tyr* к соответствующей тРНК, т.е. реакцию аминоацилирования. Авторы работы [776] обнаружили, что мутации гена *cut-18* мицелиальных грибов *Neurospora crassa*, кодирующего митохондриальную тирозил-тРНК-синтетазу, блокируют сплайсинг интронов из молекулы РНК большой субъединицы рибосомы митохондрии. Тем самым, данный белок, помимо аминоацилирования, имеет ещё и функцию матуразы. Впоследствии было также показано, что этот фермент *in vitro* катализирует и обратный сплайсинг интрона группы I в рРНК, [793].

Едва ли описанные связи трёх молекул, принимающих участие в трансляции – рибосомы, тРНК и тирозил-тРНК-синтетазы, с молекулой интрона группы I, обладающей к тому же способностью катализировать реакцию, обратную аминоацилированию, могла возникнуть случайно. По всей видимости, интрон группы I действительно принимал участие в трансляции, катализируя реакцию, обратную аминоацилированию. Изначально, скорее всего, интроны группы I входили в состав генов тРНК (т.е. эти интроны кодировались участками генов тРНК). В древнем трансляторе, описанном выше, интрон подобно челноку курсировал в процессе синтеза полипептидной цепи между двумя молекулами РНК: тРНК и рРНК, высвобождаясь посредством сплайсинга из одной и тут же обратным сплайсингом встраиваясь в другую. Вероятно, после усовершенствования транслятора интроны группы I более в трансляции участия не принимали. Однако эти интроны по-прежнему использовались для каталитического образования фосфодиэфирных связей при стемпинге апатита (при осуществлении реакций копирования полинуклеотидов), потому что создание эффективного транслятора должно было предшествовать появлению *bona fide* полимеразы. Поэтому гены интронов группы I по-прежнему присутствовали в геномах. Возможно, они присутствовали в генах тРНК (или части этих генов). Если принять такую точку зрения, то интроны в современных тРНК следует считать рудиментами интронов, некогда производимых для каталитического образования фосфодиэфирных связей при стемпинге (а ещё ранее используемые как в трансляции, так и в полимеризации нуклеотидов).

Впоследствии, после того, как в домене предков архей была создана *bona fide* полимеразы (предполагаемый процесс её возникновения описан в разделе 5.8), предки архей более не нуждались в поддержании каталитической активности интронов. Поэтому они перешли на ферментативный сплайсинг интронов, вероятно, более эффективный, каталитическая активность интронов была утрачена, сами интроны постепенно редуцировались, а в большинстве молекул тРНК они были полностью утрачены. С утратой каталитической активности интронов, встраивание их в рРНК прекратилось. Предки бактерий, чей жизненный цикл был основан на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, в отличие от предков архей, в течение длительного времени использовали стемпинг для осуществления, по крайней мере, одной из этих двух операций. Поэтому каталитическая активность интронов группы I, тоже, видимо кодируемых участками генов тРНК, была сохранена для катализа фосфодиэфирной связи при стемпинге. В результате они продолжали встраиваться в молекулы рРНК путём

обратного сплайсинга, а для их сплайсинга кодировались соответствующие матуразы. Если в силу каких-то причин сплайсинг интрона из рРНК не имел место, после цикла обратной транскрипции интрон попадал в ДНК, но после очередного раунда транскрипции вновь извлекался сплайсингом. Так продолжалось до перехода на репликацию ДНК. Интроны, не удалённые вовремя из рРНК, попавшие путём обратной транскрипции в кодирующую их ДНК и испытавшие затем репликацию ДНК были увековечены (поскольку ДНК-реплика интрона каталитической активностью не обладает и не способна осуществить аутосплайсинг). Это, видимо, и есть те интроны группы I, что изредка встречаются в генах рРНК бактерий.

Изложенные выше факты об интронах группы I в геномах бактерий, а также в геномах митохондрий и пластид, допускают несколько толкований. В качестве ещё одного объяснения можно, например, предположить, что на стадии эволюции, когда предки бактерий чередовали транскрипцию с обратной транскрипцией, произошло перерождение интронов группы I. Интроны, ранее обслуживающие нужды клетки, могли превратиться в паразитические мобильные генетические элементы. Эти интроны по-прежнему распознавали сайты в рРНК, в которые интроны ранее внедрялись в процессе трансляции, но теперь эти сайты использовались паразитирующими интронами в качестве временного пристанища. Впоследствии эти интроны случайно могли быть увековечены при переходе на репликацию ДНК.

5.5.4. Возникновение генетического кода.

Выше было описано гипотетическое молекулярное устройство для удаления аминокислот от рибозимов, функционировавшее на грани апатитового кристалла. Функционирование этого устройства должно было создавать предпосылки к возникновению трансляции.

Устройство, напомним, представляло собой цепочку РНК (прообраз мРНК), укоренённую в основу. Для избавления от случайно присоединившейся к его 2'- или 3'-концу молекулы аминокислоты, рибозимы (прообраз тРНК) укоренялся фрагментом своей молекулы в основу, так что укореняемый участок рибозима (прообраз антикодона) образовывал уотсон-криковские пары с комплементарным ему участком цепочки. Для присоединения, вероятно, использовалась структура типа «стебель-петля». Образования этого типа часто обнаруживаются в молекулах рибозимов, [775]. Антикодон современной тРНК, отметим, расположен в структуре петля-стебель. Внешний участок петли мог соединяться водородными связями с нуклеотидами укоренённой в основу РНК, а соответствующие фосфатные группы петли могли встраиваться в прилегающую строчку основы. Рибозимы, выполнявшие сходные функции и потому имеющие сходную структуру могли использовать одну и ту же укоренённую молекулу РНК. Однако, будучи различными, рибозимы эти связывались с молекулами разных аминокислот, как то имело место в высокобарных экспериментах авторов [712]. Поэтому и нуклеотидный состав укоренённой РНК (прототипа мРНК) приводился в соответствие с нуклеотидным составом рибозимных петель. Необходимость зарезервировать разные наборы нуклеотидов для обслуживания разных рибозимов, избавлявшихся от разных аминокислот, создало предпосылки для выработки генетического кода. Необходимость образования пептидной связи (во избавление от аминоацилирования) приводила к созданию олигопептидов, последовательность аминокислот в которых определялась последовательностью нуклеотидов укоренённой РНК.

Хотя описанное приспособление создавалось не ради синтеза полипептидов, его функционирование должно было сопровождаться синтезом олигопептидов, последовательности аминокислот в которых предсказуемым образом соответствовали последовательностям нуклеотидов в некоторых участках некоторой специально выделенной РНК. Если синтезируемые протеины после десорбции обнаруживали полезные свойства, например, способствовали принятию некоторым рибозимом

правильной конформации, то кодирующая его последовательность РНК фиксировалась отбором и передавалась по наследству. Впоследствии данное приспособление могло быть модифицировано в направлении специализации. Помимо резервирования укоренявшейся в основу молекулы РНК (прототип мРНК), могло также быть зарезервировано некоторое семейство рибозимов сходной структуры (прототип тРНК), более не участвующих в катализе реакций, а служащих для связывания аминокислот и доставки их к месту синтеза протеинов. Данное устройство выполняло сразу две функции: избавление организма от вездесущих молекул аминокислот и синтез протеинов. Вскоре, по мере совершенствования протеиновых ферментов, выгоды от использования их, вероятно, оказались столь велики, что некоторые из аминокислот, ещё недавно бывшие досадным недоразумением, теперь целенаправленно синтезировались организмом. Молекулярные устройства, ранее используемые для каталитического отделения аминокислоты от рибозима, теперь были модифицированы так, чтобы катализировать аминокислотирование, т.е. ту же реакцию, но в противоположном направлении.

Предложенную выше схему возникновения трансляции следует рассматривать как предварительную. Она не может быть принята без экспериментальной проверки нашего предположения о наличии диапазона физико-химических параметров, в которых ковалентная связь уединённой аминокислоты с тРНК является термодинамически стабильной, но стабильность утрачивается после образования пептидной связи. Кроме того, без экспериментальной проверки остаётся неясным, будут ли интроны группы I правильно функционировать на поверхности апатита. Все имеющиеся данные о реакциях, катализируемых этими молекулами, получены в растворах. Тем не менее, предложенная схема объясняет описанные выше свидетельства участия интронов группы I в трансляции (раздел 5.5.3). Кроме того, на основе предлагаемой схемы возникновения трансляции может быть построена схема эволюции генетического кода, успешно объясняющая ряд его особенностей, изложенная в следующем разделе.

5.5.5. Эволюция транслирующих устройств и генетического кода.

Описанное выше незамысловатое приспособление, осуществлявшее трансляцию на апатитовом кристалле при помощи мРНК, тРНК и интрона группы I, вероятно, могло быть использовано лишь для синтеза небольших олигопептидов. Вероятно, появлению рибосомы или других молекулярных устройств, способных синтезировать высокомолекулярные полипептиды, предшествовал период, когда и репликация, и трансляция осуществлялись на поверхности апатитовых кристаллов. Ниже сделана попытка понять, в самых общих чертах, как примитивный транслятор, изначально предназначенный для отделения аминокислот от рибозимов, мог эволюционировать в сложнейшую молекулярную машину, какой является современная рибосома. В частности, сделана попытка понять, допустимо ли моделировать историю жизни основываясь на филогенетическом древе рибосомной РНК, Рис 5-2, или же это древо характеризует лишь историю рибосомы самой по себе. В качестве источника информации будут использованы сведения об особенностях генетических кодов и их трансляции, представленные ниже.

5.5.5.1. Особенности генетического кода.

В современной системе трансляции используется единый для всех организмов триплетный (т.е. каждый кодон состоит из трёх символов) генетический код, хотя имеются и разночтения, Таблица 5-2.

Таблица 5-2. Универсальный генетический код.

Из обзора [716].

Universal genetic code, 2007

First position (5' end)	Second codon position				Third position (3' end)
	U	C	A	G	
U	UUU-Phe UUC-Phe UUA-Leu UUG-Leu	UCU-Ser UCC-Ser UCA-Ser UCG-Ser	UAU-Tyr UAC-Tyr UAA-Ter UAG-Pyl (Ter)	UGU-Cys UGC-Cys UGA-Sec (Ter) UGG-Trp	U C A G
C	CUU-Leu CUC-Leu CUA-Leu CUG-Leu	CCU-Pro CCC-Pro CCA-Pro CCG-Pro	CAU-His CAC-His CAA-Gln CAG-Gln	CGU-Arg CGC-Arg CGA-Arg CGG-Arg	U C A G
A	AUU-Ile AUC-Ile AUA-Ile *AUG-Met	ACU-Thr ACC-Thr ACA-Thr ACG-Thr	AAU-Asn AAC-Asn AAA-Lys AAG-Lys	AGU-Ser AGC-Ser AGA-Arg AGG-Arg	U C A G
G	GUU-Val GUC-Val GUA-Val GUG-Val	GCU-Ala GCC-Ala GCA-Ala GCG-Ala	GAU-Asp GAC-Asp GAA-Glu GAG-Glu	GGU-Gly GGC-Gly GGA-Gly GGG-Gly	U C A G

Notes: * Initiation codon; Ter, codon of termination of the polypeptide chain; Sec, selenocysteine (21st amino acid in the universal genetic code [9, 10]); Pyl, pyrrolysine (22nd amino acid in the code [15, 17, 19]); UGA encodes Sec in some protozoans, lower plants, mammals, and fungi [13]; UAG is the Pyl codon in the code of archaeobacterium *Methanosarcina barkeri* [18].

Как видно из таблицы, код является вырожденным в отношении многих аминокислот. Иначе говоря, для обозначения одной аминокислоты может быть использовано несколько кодонов (до шести).

В некоторых организмах или их органеллах (митохондрии, хлоропласты) обнаруживаются отклонения от стандартного кода. Современные сведения об отклонениях от стандартного кода представлены в цвете на диаграмме Рис 5-6.

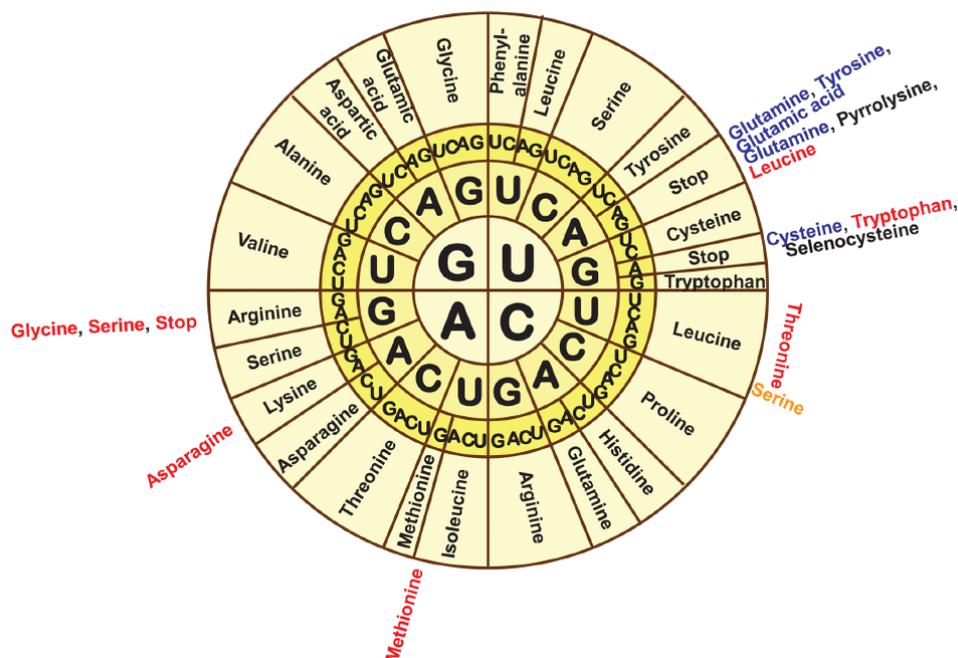


Рис 5-6. Стандартный генетический код и неканонические варианты кодонов. Стандартный код показан круговой диаграммой. Известные на текущий момент различия показаны вне круга диаграммы: красный цвет соответствует митохондриям, синий – инфузориям, оранжевый – дрожжевым грибкам. Селеноцистеин (Sec) и пирролизин (Pyl) показаны чёрным. *Из обзора [719].*

Далее будет показано, что задача восстановления истории универсального генетического кода несколько упрощается, если сосредоточиться сначала на особенностях его знаков препинания – стартового кодона и стоп-кодона. Отчасти это связано с тем, что подавляющее число отклонений от стандартного кода тем или иным путём ассоциируются с этими двумя кодонами.

Стартовый кодон и стоп-кодоны. В стандартном (т.е. универсальном генетическом) коде стартовым кодоном, инициирующим трансляцию, служит триплет AUG, а триплеты UGA, UAA, UAG являются стоп-кодонами. При этом AUG кодирует также аминокислоту метионин (Met), входящую в число протеиногенных, тогда как стоп-кодоны аминокислот не кодируют. Для считывания стартового кодона AUG используется специализированная молекула тРНК, т.н. инициирующая тРНК (*initiator tRNA*), снаряжённая (аминоацилированная) метионином (Met). У бактерий инициирующая тРНК снаряжается остатком модифицированного метионина – N-формилметионином (fMet), [720-723]. Тем самым Met (у бактерий, соответственно, fMet) становится первой (инициирующей) аминокислотой синтезируемого полипептида. Этот аминокислотный остаток обычно удаляется после завершения трансляции, [724].

Завершение трансляции (терминация) регулируется специализированными белковыми факторами, называемыми факторами терминации (release factors, RFs), [725]. Тем самым, молекулы тРНК в терминации участия не принимают. Терминация, в отличие от инициации, не сопровождается присоединением аминокислотного остатка к полипептидной цепи. У нас нет возможности обсуждать механизм терминации, о котором сейчас многое известно, см. например работу [726] и содержащиеся в ней ссылки. В последующем изложении будет использован тот факт, что у эукариотов в терминации принимает участие фактор eRF1, который распознаёт все три стоп-кодона. Аналогичный фактор имеется также у архей. У бактерий имеется два фактора, RF1 и RF2, распознающие, соответственно, UAA/UAG и UAA/UGA, [727-729]. Структурные исследования показали, что молекулы перечисленных факторов своей формой имитируют молекулы тРНК, [726,730,731].

Определённая информация о становлении генетического кода содержится в данных о различиях – т.е. обнаруживаемых иногда отклонениях от стандартного кода. На сайте *National Center for Biotechnology Information* приведены данные о 25 вариантах генетического кода, отличающиеся от канонического, [732]. Действительное число кодов, вероятно, ещё больше. В силу не совсем понятных причин авторы считают разными коды, отличающиеся стоп-кодонами, но различия стартовых кодонов обычно интерпретируются как вариации того же кода. По этой причине, в частности, неканонические варианты стартовых кодонов не показаны на диаграмме Рис 5-6. При поисках возможной схемы становления генетического кода данные о неканонических стартовых кодонах оказываются столь же ценными и информативными, как и сведения о стоп-кодонах.

Вариации стартового кодона. В полной мере стартовый кодон AUG каноническим может быть назван лишь применительно к эукариотам. У прокариотов этот стартовый кодон является преобладающим, но триплеты GUG и UUG тоже достаточно часто служат сигналом для начала трансляции. У бактерии *Escherichia coli*, например, иницирование трансляции обозначается как AUG, GUG и UUG, соответственно, для 83, 14 и 3% кодируемых белков, [733]. У *Bacillus subtilis* трансляция 78, 9 и 13% белков, соответственно, инициируется названными тремя кодонами, [734]. У архей картина

сходная, но есть и отличия. Стартовый кодон AUG наиболее характерен и для этого домена. В целом, синтез 70-90% белков у архей инициируется кодоном AUG, однако у гипертермофилов *Aeropyrum pernix*, *Hyperthermus butylicus*, *Methanopyrus kandleri* все три кодона инициируют трансляцию одинаково часто; у *Pyrobaculum aerophilum* трансляции 32% белков инициируется кодоном GUG, [735].

Сопоставление кодонов, инициирующих синтез гомологичных белков, приводит к выводу о взаимозаменяемости триплетов AUG, GUG и UUG, по крайней мере, у бактерий. Хотя кодон, обозначающий начало трансляции того или иного гена, очевидно, является наследуемым признаком, трансляция гомологичных белков в разных видах может инициироваться разными кодонами, [734].

Хотя триплетами AUG, GUG и UUG инициируется синтез абсолютного большинства белков, у небольшого количества белков обнаруживаются альтернативные инициирующие триплеты. У бактерий число таких белков всегда составляет менее 1% от общего количества, [734]. У эукариотов, для которых только и имеются подробные сведения, это малые доли процента. В геноме человека обнаружено 59 белков, трансляция которых начинается с кодонов, не являющихся каноническим стартовым (AUG), таких как CUG, GUG, AUC, UUG, AUA, AUU, ACG, [736]. Теми же триплетами инициируется трансляция некоторых генов *Drosophila melanogaster* (не менее 27 генов), [737]. Инициирование трансляции данными триплетами носит неслучайный характер. Среди них, например, никогда не были встречены AAG или AGG, лишь одним символом отличающиеся от канонического AUG.

Альтернативные стартовые кодоны часто входят в состав т.н. *non-AUG-initiated N-terminal extensions* – небольших отрезков ДНК, расположенных в начале гена, за которыми обнаруживается канонический стартовый кодон AUG. Трансляция может начинаться как на стандартном кодоне, так и на альтернативном, предшествующем стандартному. Явление это называют альтернативным инициированием (*alternative initiation*). В общей сложности известно более сотни примеров альтернативного инициирования у человека, мыши, насекомых и растений. Механизм этого явления активно исследуется, его природа и биологическое значение пока не выяснены, [736-740].

Важную особенность универсального генетического составляет его неоднозначность в отношении стартового кодона AUG (аналогичное явление имеет место для двух стоп-кодонов, см. ниже). Триплет AUG одновременно используется как стартовый кодон и как кодон, обозначающий метионин (Met). Знаменующий начало трансляции кодон AUG располагается в начале транслируемой мРНК. Этот кодон считывается специализированной тРНК, т.н. *инициирующей* тРНК. У архей и эукариотов инициирующая тРНК снаряжается (аминоацилируется) Met, а у бактерий –fMet. В результате Met (fMet) оказывается первой аминокислотой в синтезируемой полипептидной цепи, обычно удаляемой по завершении трансляции. При расположении кодона AUG в позициях, не являющихся начальной, он считывается иной тРНК, отличающейся от инициирующей, но с таким же антикодоном, и в этом случае рибосома присоединяет Met к полипептидной цепи. У эукариотов сигналом для распознавания триплета AUG как стартового кодона служит отрезок не кодирующей последовательности нуклеотидов в начале мРНК, т.н. «Kozak's consensus sequence», состоящая из четырёх-шести нуклеотидов, предшествующих стартовому кодону, и одного-двух нуклеотидов непосредственно после стартового кодона, [741].

Интересно отметить, что структура инициирующей тРНК обнаруживает особенности, отсутствующие у других молекул тРНК. При исследовании кристаллической структуры инициирующей тРНК *Escherichia coli* авторами работы [742] были обнаружена уникальная особенность конформации двойной спирали участка структуры стебель-петля, содержащего антикодон. Согласно выводам авторов, эта геометрическая особенность позволяет рибосоме отличить инициирующую тРНК от прочих молекул тРНК. Примечательно также, что при альтернативном инициировании (т.е. когда в качестве

стартового использован кодон, отличный от AUG) считывание стартового кодона тоже осуществляется иницирующей тРНК, хотя её антикодон комплементарен AUG и поэтому не соответствует кодону, используемому в качестве стартового. Синтез полипептидной цепи по-прежнему начинается с Met, [743,738]. Тем самым, при иницировании трансляции тип молекулы РНК оказывается важнее кодона.

В последующей дискуссии нам понадобится ещё одна особенность иницирования – синтез иницирующей аминокислоты у бактерий. Биосинтез подавляющего числа аминокислот в клетках предшествует присоединению соответствующей аминокислоты к тРНК (аминоацилированию). Такая последовательность событий вполне согласуется с предложенной выше схемой возникновения трансляции, в которой изначально функция транслирующего устройства сводилась к отделению аминокислот от рибозимов. Однако у N-формилметионина (fMet), – аминокислоты, с которой начинается синтез полипептидной цепи у бактерий, – схема синтеза иная. Эта аминокислота образуется модифицированием метионина (присоединением формильной группы), уже соединённого с тРНК (иницирующей тРНК), [744]. Существует ещё одна аминокислота, селеноцистеин, синтезируемая сходным образом, модифицированием остатка иной аминокислоты (серина), соединённой с тРНК. Соответствующий селеноцистеину кодон UGA совпадает с одним из стоп-кодонов. Вероятное объяснение этих фактов будет предложено позже.

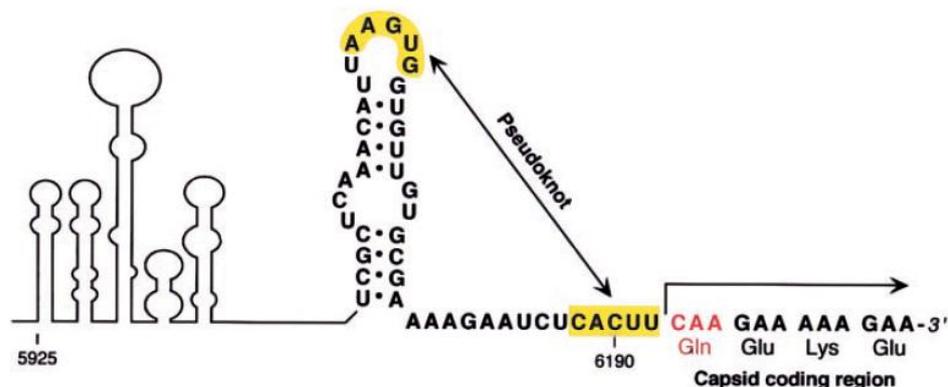


Рис 5-7. Участок РНК, непосредственно предшествующий последовательности, кодирующей белок капсиды одного из вирусов насекомых. Для иницирования трансляции вместо стартового кодона AUG использован кодон глутамин САА (обозначен красным). Расположенная перед САА структура псевдоузла (pseudoknot) обеспечивает иницирование трансляции. *Из обзора [745].*

Ещё один интересный факт, который понадобится нам в дальнейшем, состоит в том, что иницирование трансляции у некоторых вирусов может быть осуществлено без Met или fMet и даже без иницирующей тРНК. В работе [746], например, показано, что трансляция молекулы РНК, кодирующей капсиду некоторого вируса насекомых, начинается с глутамин, а не метионина, и иницирование осуществляется без участия иницирующей тРНК. Непосредственно перед кодоном глутамин в молекуле РНК обнаруживается псевдоузел, Рис 5-7. Наличие этой структуры, как показали авторы, достаточно для иницирования трансляции.

Разночтения стоп-кодонов. Варианты кодов, в которых обнаруживаются те или иные отклонения в прочтении стоп-кодонов, более разнообразны, чем варианты неканонических стартовых кодонов. Известны случаи использования одного из стоп-кодонов канонического кода для кодирования аминокислоты, есть коды, в которых кодоны, обозначающие аминокислоты в стандартном коде, используются в качестве стоп-кодонов. Со стоп-кодонами ассоциируются и разночтения стандартного кода: два из трёх стоп-кодонов используются также для кодирования аминокислот (селеноцистеина и пирролизина). Перечисленные отклонения чаще всего обнаруживаются в геноме

митохондрий, бактерий (*Mycoplasma*), диплононад, некоторых зелёных водорослей и различных инфузорий.

У большинства диплононад кодоны UAA и UAG обозначают не окончание трансляции, а остаток глутамина (Glu), [747]. Такой код обнаруживается у всех диплононад, кроме представителей рода *Giardia*, трансляция в которых основана на универсальном генетическом коде. Аналогичные отклонения обнаруживаются у зелёных водорослей родов *Acetabularia* и *Batophora* семейства *Dasycladaceae*. Та же аномалия обнаруживается у оксимонад (*Oxymonadae*, малоизученный класс анаэробных жгутиконосцев, обитающих в кишечнике термитов). У оксимонад кодоны UAA и UAG соответствуют Glu, а UGA – единственный стоп-кодон, [748]. Подобным образом, UAA и UAG кодируют Glu, а UGA – единственный стоп-кодон у многих инфузорий родов *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Stylonychia* и *Oxytricha*, [749]. (Кроме того, у *Tetrahymena* в дополнение к типичной глутамин-специфичной тРНК, считывающей стандартные кодоны глутамина CAA и CAG, были обнаружены две необычные глутамин-специфичные молекулы тРНК, считывающие UAA и UAG.) В то же время, у нескольких представителей инфузорий рода *Euplotes* аминокислота Glu кодируется как CAA и CAG, соответственно универсальному коду. Триплеты UAA и UAG у представителей этого рода являются стоп-кодонами, как в универсальном коде, но третий стоп-кодон универсального кода – UGA, кодирует цистеин (Cys), [749].

В геноме бактерий рода *Mycoplasma* триплеты UGA и UGG кодируют триптофан (Trp), тогда как в универсальном коде только UGG соответствует Trp, а UGA является стоп-кодоном, [750,751]. Сходным образом UGA кодирует Trp у инфузорий *Blepharisma americanum* и *Coldoda*, [752]. Известны десятки примеров геномов митохондрий, в которых стоп-кодон UGA стандартного кода тоже кодирует Trp. Есть примеры митохондрий, в которых стоп-кодон стандартного кода UAA соответствует тирозину (Tyr), есть коды митохондрий, в которых канонический стоп-кодон UAG соответствует лейцину (Leu), а для некоторых митохондрий тот же кодон соответствует аланину (Ala) [753].

Как видно из приведённых примеров, одинаковые отклонения от универсального генетического кода часто обнаруживаются в филогенетически удалённых геномах, так что вариации кода не отслеживаются методами филогенетического анализа. С особой наглядностью этот феномен был продемонстрирован для геномов митохондрий и инфузорий, где идентичные отклонения от стандартного кода обнаруживаются у удалённых видов, тогда как представители одного семейства могут использовать разные стоп-кодоны. У исследователей создаётся впечатление, что аналогичные вариации генетического кода возникали независимо десятки раз, [794,753-754].

Выше уже было упомянуто, что стоп-кодоны считываются без участия тРНК специальным белковым фактором, т.н. release factor. У эукариотов этот фактор обозначается как eRF1. При отклонениях от универсального кода, так или иначе затрагивающих стоп-кодон, для правильного прочтения стоп-кодонов необходимы соответствующие изменения в структуре молекул eRF1. Особенности структуры факторов eRF1 инфузорий неоднократно становились объектом исследований. Перекодировки стоп-кодонов действительно сопровождаются изменениями в eRF1, причём, подобно перекодировкам, эти изменения также не отслеживаются методами филогенетического анализа, [755-758]. Инфузории, в геноме которых UGA кодирует Trp, например, обнаруживают сходные изменения фактора eRF1, однако в геноме их общего предка, согласно филогенетическим реконструкциям, этот кодон использовался как стоп-кодон, [752]. Как если бы идентичные изменения генетического кода происходили неоднократно, независимым образом, и при этом соответствующие изменения последовательностей, кодирующих eRF1, тоже всяких раз оказывались сходными и тоже независимым образом.

Отдельного обсуждения заслуживает неоднозначность универсального кода в отношении триплетов UAG и UGA. Эти триплеты одновременно являются стоп-кодонами и используется для кодирования двух аминокислот: пирролизина и селеноцистеина.

Пирролизин (Pyl), называемый иногда 22-й аминокислотой, очень редок. Обнаруживается только у метанобразующих архей и бактерий. В природе эта аминокислота образуется из двух молекул лизина, [759]. Тем самым Pyl образуется модификацией лизина, однако, в отличие от нестандартных аминокислот, таких как гидроксизин (hydroxylysine), N-метиллизин (methyllsine) и гипузин (hypusine), образуемых путём посттрансляционной модификации лизина, образование Pyl предшествует трансляции.

После синтеза, подобно стандартным аминокислотам, Pyl соединяется с специфичной для него тРНК, обозначаемой $tRNA^{Pyl}$. Сигналом того, что триплет UAG соответствует Pyl, а не прекращению трансляции, служит наличие в мРНК структуры, именуемой PYLIS. PYLIS (*pyrrolysine insertion sequence*) представляет собой отрезок РНК более или менее фиксированного состава со структурой стебель-петля. Для того, чтобы кодон был прочтён $tRNA^{Pyl}$ и остаток Pyl присоединился к полипептидной цепи, последовательность PYLIS должна следовать непосредственно за UAG в мРНК, [760]. Впрочем, наличие последовательности PYLIS не является абсолютно необходимым, в её отсутствие триплет UAG прочитывается как стоп-кодон в большинстве случаев, но иногда имеет место синтез содержащего Pyl белка, [761]. Ещё одно обстоятельство, отличающее Pyl от канонических аминокислот, состоит в том, что соответствующая этой аминокислоте тРНК (как у бактерий, так и эукариотов) обнаруживает уникальные особенности. Вторичная и третичная структура молекулы тРНК, связывающейся с Pyl, отличается от структуры канонических тРНК. Однако отличия, впрочем, эти не такие значительные, как у тРНК (обсуждаемой ниже) аминокислоты Sec, [762,763].

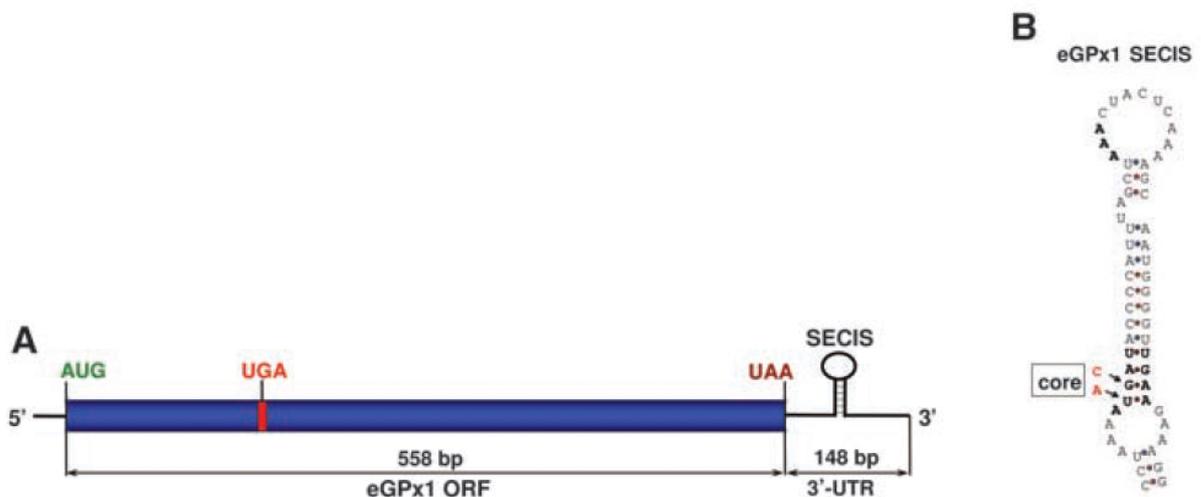


Рис 5-8. Кодон UGA в мРНК прочитывается рибосомой как селеноцистеин (Sec) при наличии последовательности SECIS на 3'-конце молекулы мРНК. **А:** Схема мРНК селенопротеина eGPx1 инфузории *Euplotes crassus*. Показано расположение стартового кодона (AUG), Sec(UGA), стоп-кодона UAA и последовательности SECIS. **В:** Последовательность SECIS из мРНК селенопротеина eGPx1. В растворе молекула имеет структуру стебель-петля.
Из работы [715]

Аминокислота селеноцистеин (Sec) представляет собой структурный аналог цистеина и серина. В селеноцистеине атом селена занимает ту позицию, которая в цистеине занята атомом серы, а в серине, соответственно, атомом кислорода. Подобно Pyl, эта аминокислота является редкой. Содержащие Sec белки обнаруживаются не во всех организмах.

Подобно Pyl, Sec кодируется одним из стоп-кодонов. В отличие от Pyl, кодируемым триплетом UAG, Sec кодируется UGA. Для того чтобы этот триплет был прочтён как Sec,

а не остановка трансляции, необходимо присутствие в мРНК последовательности нуклеотидов, называемой *selenocysteine insertion sequence* (SECIS), Рис 5-8(A), подобно тому, как последовательность PYLIS требуется для прочтения кодона Pyl. Подобно PYLIS, последовательность SECIS, около 60 нуклеотидов длиной, в растворе имеет структуру стебель-петля, Рис 5-8(B). У бактерий последовательность SECIS располагается в мРНК за соответствующим кодоном UAG, у архей и эукариотов этот элемент расположен вблизи 3'-конца мРНК, [719].

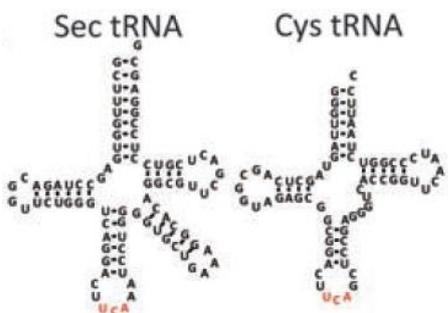


Рис 5-9. Сравнение вторичной структуры тРНК селеноцистеина (Sec tRNA) и цистеина (Cys tRNA) инфузории *E. crassus*. Красным выделен антикодон UCA. Из работы [764].

Биосинтез Sec – это многостадийный процесс, отличный от биосинтеза канонических аминокислот, в некотором отношении сходный с биосинтезом упоминавшегося выше fMet. Сначала соответствующая молекула tRNA^{Sec} аминоацилируется серином с образованием Ser-tRNA^{Sec}. Затем остаток серина преобразуется в селеноцистеин, и в результате получается молекула Sec-tRNA^{Sec}, используемая в синтезе полипептидов, [765]. Тем самым, синтез аминокислоты завершается уже после присоединения её к тРНК.

Интересно отметить, что молекулы tRNA^{Sec} (т.н. selenocysteine inserting tRNAs) обнаруживают ряд уникальных черт, отличающих её от стандартных тРНК, [764]. В качестве иллюстрации на Рис 5-9 показана вторичная структура молекул tRNA^{Sec} и tRNA^{Cys} инфузории *Euplotes crassus*. Характерная «фука», отсутствующая у tRNA^{Cys}, составляет один из структурных элементов типичных для selenocysteine inserting tRNAs, [764].

С биохимической точки зрения Pyl и Sec имеют мало общего, однако имеется ещё одно обстоятельство их сближающее: для обеих аминокислот не вполне ясны причины, из-за которых они синтезируются организмами. Для большинства селенопротеинов (т.е. белков, в состав которых входит Sec) известны гомологи, обнаруживающие цистеин (Cys) в соответствующих позициях полипептидной цепи, [766]. Сходные явления описаны и для белков, содержащих Pyl, [767]. Утрата Sec и Pyl в гомологах предполагает, что без этих двух аминокислот несложно обойтись, и тогда становится непонятным, для чего нужно было их создавать? Реликтами, сохранившимися с древнейших времён, когда список протеиногенных аминокислот был скуден, Sec и Pyl быть не могут. Механизм их биосинтеза и филогенетические данные для соответствующих аминоацил-тРНК-синтетаз свидетельствуют, что обе аминокислоты возникли позднее стандартных двадцати аминокислот.

Ещё одно интересное явление было обнаружено при исследовании механизма трансляции Sec в организме инфузории *Euplotes crassus*, выполненном авторами [768]. В геноме этой инфузории используется (уже обсуждавшийся выше) вариант нестандартного генетического кода, в котором UAA и UAG являются стоп-кодонами, как в универсальном коде, но третий стоп-кодон универсального кода – UGA, кодирует цистеин (Cys). При этом, как было обнаружено авторами [768], *E. crassus* содержит восемь

селенопротеинов. Тем самым триплет UGA используется одновременно для кодирования двух аминокислот - Cys и Sec. Более того, авторам удалось обнаружить ген, в котором кодон UGA встречается несколько раз, и лишь один из них, закономерным образом, транслируется как Sec, а остальные – как Cys. Согласно выводам авторов, при появлении триплета UGA среди последних двадцати кодонов мРНК (содержащей последовательность SECIS) он будет прочитан рибосомой как Sec, а в остальных позициях триплет прочитывается как Cys.

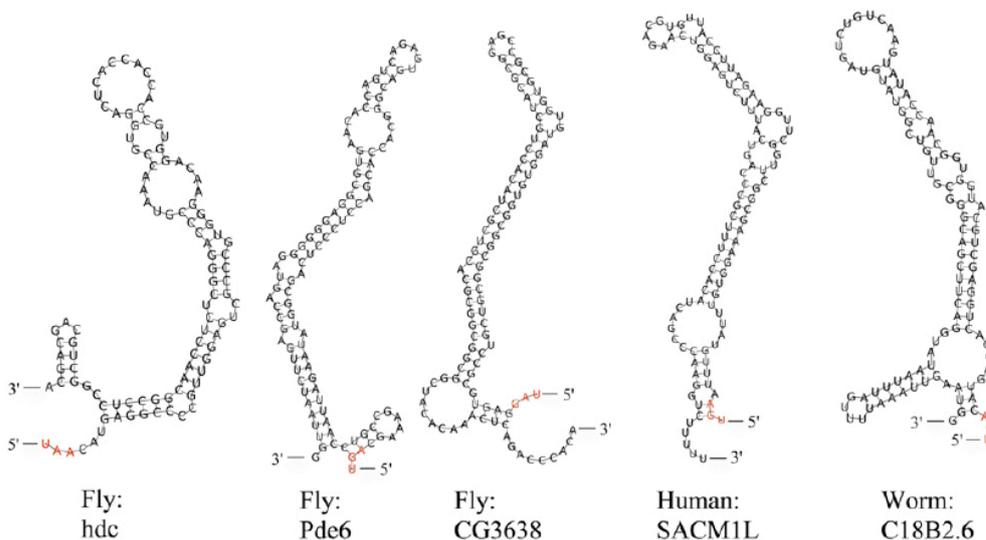


Рис 5-10. Структуры РНК, ассоциирующиеся с явлением stop-codon readthrough. Структуры обнаруживаются мРНК генов, непосредственно за стоп-кодоном. Стоп кодоны обозначены красным цветом. Из работы [769]

Stop-codon readthrough. Описание особенностей стоп-кодонов будет неполным без упоминания явления *stop-codon readthrough events*, заключающегося в том, что в определённых случаях рибосома не завершает трансляцию на стоп-кодоне, а «прочитывает» его, вставляя аминокислоту в соответствующей позиции синтезируемой полипептидной цепи, и трансляция продолжается за стоп-кодон, до обнаружения следующего стоп-кодона на мРНК. Явление это характерно для вирусов, [770], было оно обнаружено у бактерий, [771], дрожжей [772], у *Drosophila*, других насекомых, у нематод, [769], у млекопитающих и человека, [773,769].

Установлено, что явление stop-codon readthrough не является какой-либо случайной ошибкой трансляции, [772,769,771]. *In vivo*, соответствующий стоп-кодон в большинстве случаев прочитывается как сигнал остановки трансляции, и лишь для небольшой доли транслируемых мРНК имеет место *readthrough*. Процент таких событий может регулироваться различными факторами, в том числе эпигенетическими. В мРНК вирусов за стоп-кодоном, вовлечённым в явление *readthrough*, обычно следует структура, именуемая псевдоузлом (*pseudoknot*). Псевдоузел охватывает участок мРНК, следующий за стоп-кодоном [770]. У эукариотов в таких мРНК обнаруживаются структуры петля-стебель и более сложные образования, Рис 5-10. Структуры эти начинаются непосредственно на стоп-кодонах (на рисунке показаны красным цветом).

Ниже предложена схема эволюции генетического кода, позволяющая объяснить особенности стартового и стоп- кодонов, перечисленные в двух последних подразделах.

5.5.5.2. Интерпретация. Становление генетического кода.

Согласно гипотезе, изложенной в разделе 5.5.2, трансляции возникла в результате эволюционного усовершенствования молекулярного устройства, изначально предназначенного для удаления аминокислот с рибозимов. Основу устройства, напомним, составляла укоренённая в апатитовую основу одноцепочечная РНК, к которой

«пришвартовывались» избавлявшиеся от аминокислот рибозимы. Дизайн устройства таков, что взаимное расположение одноцепочечного полинуклеотида в основе и полипептида на грани кристалла диктуется формой и размерами молекул обслуживаемых рибозимов. Поэтому обсуждаемое молекулярное приспособление могло обслуживать лишь некий класс рибозимов, структурно сходных между собой. Для успешной работы всех функционировавших в организме рибозимов, видимо, требовался целый набор подобных устройств. Эволюционное усовершенствование каждое из устройств должно было привести к появлению собственного кода трансляции. Тем самым, изначально должно было иметь место сосуществование нескольких трансляторов в одном организме, каждый со своим генетическим кодом.

В современных организмах используется лишь один транслятор – рибосома. Все без исключения рибосомы являются гомологами (и на этом основано использование рибосомной РНК для построения единого филогенетического древа жизни). Трансляция во всех организмах опять-таки осуществляется на основании единого кода. Считывающее устройство – инструментарий тРНК – однотипно во всех организмах. Возникает вопрос, как подобное единообразие могло возникнуть в процессе эволюционного усовершенствования примитивных трансляторов, описанных выше, изначально существенно различавшихся своими характеристиками?

Можно, например, предположить, что высокая степень вырожденности универсального кода в отношении некоторых аминокислот есть следствие унификации кодов. Если изначально существовало несколько трансляторов, каждый со своим вариантом кода, могла возникнуть ситуация, когда разные трансляторы по-разному шифруют одну и ту же аминокислоту. Сведение различных кодов воедино, так что считывающие устройства (аналоги тРНК) одного транслятора поглощаются другим, могло бы привести к появлению ситуации, сходной с современной, когда одной аминокислоте соответствует несколько различных кодонов. Описанные выше отклонения от универсального генетического кода при таком подходе предстают как некий «акцент», сохранившийся от утраченных генетических языков. Однако попытки истолковать в подобном ключе весь набор имеющихся данных оказываются малоубедительными. Ниже показано, что разночтения, вырожденность кода и ряд других особенностей трансляции в современных организмах проще объяснить как результат эволюционного усовершенствования *одного* транслятора.

Причины вырожденности кода. Предположим, что в некотором организме функционировало несколько трансляторов, подобных описанным в начале раздела, изначально предназначенных для отделения аминокислот от рибозимов и впоследствии перепрофилированных для синтеза полипептидов. Те или иные особенности каждого из трансляторов изначально определялись особенностями обслуживаемых рибозимов, поэтому каждый транслятор имел свои индивидуальные геометрические характеристики, свой код и т.д. Изначально код, наверное, не был однозначным. Если один рибозим спонтанно аминоацилировался разными аминокислотами, то и соответствующий кодон должен был соответствовать разным аминокислотам. Тем самым, однозначность универсального генетического кода, используемого рибосомой, скорее всего, является результатом отбора на более поздней стадии эволюции транслятора, когда он целенаправленно использовался для синтеза полипептидов (а не для отделения аминокислот от рибозимов). Однозначность кода является важным преимуществом, поскольку в отсутствие её результат трансляции оказывается непредсказуемым.

Вырожденность кода в отношении той или иной аминокислоты определялась степенью разнообразия антикодонов рибозимов, испытывавших спонтанное аминоацилирование этой аминокислотой. Чем больше было рибозимов, из числа обслуживаемых одним транслятором, обнаруживавших сродство к некоторой аминокислоте, тем выше была

вероятность высокой степени вырождения кода данного транслятора в отношении данной аминокислоты.

Предположим теперь, что в изменившихся условиях аминокислоты перестали быть вредным компонентом среды, и задача отделения их от рибозимов более не стояла на повестке дня. Трансляторы, ранее синтезировавшие полипептиды ради пассивирования аминокислот, теперь производили их ради последующего использования. Сырьём для синтеза служили аминокислоты, целенаправленно синтезируемые организмами. В новых условиях критерием полезности транслятора для организма служила не способность его связывать аминокислоты, а эффективность, с которой транслируемые белки позволяли организму решать новые задачи, поставленные перед ним в процессе эволюционного развития. На этой стадии расширение списка используемых аминокислот было, наверное, одной из первоочередных задач, а вырожденность кода, как показано ниже, существенно облегчает её решение.

Исходный набор аминокислот, используемых при синтезе полипептидов, был скуден, так аминокислоты были естественного (абиогенного) происхождения. После того, как был освоен синтез аминокислот, ошибки синтеза вследствие случайных мутаций приводили к возникновению новых аминокислот с какими-то свойствами, отсутствующими у аминокислот-предшественниц, которые потенциально могли бы быть использованы для создания более совершенных молекулярных машин. Способность транслятора к расширению списка кодируемых аминокислот в этих условиях должна была стать одним из важных факторов отбора, обеспечившим определённые преимущества организму – обладателю. Эта способность во многом определялась степенью вырождения кода.

Рассмотрим сначала предельный случай кодирующего устройства, использующего невырожденный генетический код, в котором каждой аминокислоте соответствует в точности один кодон. Для внесения новой аминокислоты в список кодируемых аминокислот, помимо аминокислоты самой по себе, нужна также молекула-носитель, способная с данной аминокислотой связаться (аналог тРНК), нужно появление нового кодона на мРНК и появление соответствующего антикодона на молекуле-носителе. Одновременное возникновение нескольких мутаций, обеспечивающих осуществление перечисленных событий, крайне маловероятно.

Рассмотрим теперь случай высокой вырожденности генетического кода. В целях наглядности предположим, что изначально транслятор обслуживал синтез полипептидов, состоявших из восьми аминокислот, и каждой аминокислоте соответствовало восемь триплетных кодонов (так что общее число кодонов равнялось 64, как в современном универсальном коде). Допустим, ошибки синтеза какой-то аминокислоты, происходящие вследствие мутаций, привели к появлению новой аминокислоты, и в результате некоторая часть тех восьми кодонов, что обслуживали прежнюю аминокислоту, отошли к новой. Новая аминокислота вовлекается в синтез полипептида без каких-либо изменений всей системы трансляции. Часть молекул тРНК, обслуживавших встраивание прежней аминокислоты в белки, передаётся новой аминокислоте. В том случае, если вовлечение новой аминокислоты даёт существенные преимущества, соответствующая мутация закрепляется. Список используемых аминокислот при этом расширяется, а степень вырожденности кода уменьшается.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что транслятор, который обслуживал рибозимы, ныне известные как тРНК, отличался высокой изначальной степенью вырождения своего генетического кода. Это позволило ему быстро расширить список кодируемых аминокислот. Другие трансляторы, функционировавшие в том же организме или в других организмах, отличались меньшей вырожденностью кода. Они оказались не в состоянии расширить список аминокислот с той же быстротой и потому исчезли.

Причины триплетности кода. Триплетность кода, скорее всего, является следствием структурных особенностей рибозимов, ставших прообразами современных тРНК. Первая из описанных выше стадий процесса трансляции, в течение которой внешний участок петли РНК некоторого рибозима (прообраз тРНК) «пришвартовывается» к одноцепочечной линейной молекуле РНК, расправленной в основе (прообраз мРНК), предполагает образование водородных связей между несколькими нуклеотидами петли и линейной молекулы. Поскольку молекула-прообраз мРНК расправлена в основе и не способна изгибаться, количество образующихся пар нуклеотидов лимитируется кривизной петли. Кривизна петли в первом приближении определяется её длиной. Конструкция обсуждаемого транслятора допускает вариации параметров петли, поэтому после перепрофилирования транслятора, когда он использовался для синтеза полипептидов с целью последующего их использования, диаметр петли и размер кодона могли стать одним из факторов отбора. Остаётся неясным, был ли код транслятора, развившегося в рибосому, триплетным с самого начала, ввиду каких-то особенностей молекул обслуживаемых рибозимов, или же триплетность возникла в результате последующего отбора. И в том, и в другом случае триплетность, в соединении с техническими особенностями транслятора позволяет объяснить ещё один наблюдаемый феномен: число различных молекул тРНК существенно меньше числа считываемых кодонов.

Физическим носителем кода, его считывающим устройством являются молекулы тРНК. Антикодон (выделенный участок тРНК) представляет собой последовательность из трёх нуклеотидов, которые образуют водородные связи с нуклеотидами кодона – участка на мРНК. Известно, что только первые два нуклеотида кодона образуют канонические уотсон-криковские пары, а третья пара обычно оказывается неканонической. Использование неканонических пар нуклеотидов позволяет уменьшить общее число используемых молекул тРНК, поскольку один нуклеотид может образовывать несколько неканонических пар (на практике две). По этой причине общее число молекул тРНК в современных организмах (около 40) меньше общего числа кодонов (64), [774].

Механизм считывания кода, при котором лишь первые два нуклеотида кодона образуют уотсон-криковские пары, а третья пара нуклеотидов оказывается неканонической, вероятно, возникла на ранней стадии эволюции транслятора, когда процесс трансляции был организован на поверхности апатитового кристалла. Поскольку несущая кодон РНК имеет форму петли, а кодирующая молекула РНК (прообраз мРНК), будучи укоренена в основу, является прямолинейной, третий нуклеотид кодона оказывается на большем удалении от кодирующей молекулы, нежели первые два. Поэтому третья пара нуклеотидов оказывается неканонической.

Возникновение знаков препинания кода. В процессе эволюции трансляторы, наверное, совершенствовались, и это создавало предпосылки для синтеза всё более совершенных и разнообразных белков, обслуживавших всё более разнообразные потребности организмов, эволюционировавших в направлении усложнения. Коль скоро разнообразие не может быть обеспечено без удлинения полипептидной цепи, возникала необходимость получения белков всё большей длины. В этих условиях в качестве полезного нововведения могли появиться специальные генетические сигналы, знаменующие инициацию трансляции и её завершение. Наш следующий шаг состоит в выяснении, в самых общих чертах, как функционировала эта система знаков препинания.

Сопоставление инициирования и терминации трансляции. В современных организмах механизмы инициирования трансляции и её прерывания различаются принципиальным образом. Выше указывалось, что стартовый кодон распознаётся иницирующей тРНК (*initiator tRNA*), снаряжённой (аминоацилированной) Met (у бактерий fMet), тогда как стоп-кодона распознаются белковыми факторами терминации (*release factors*, RFs).

Трансляция начинается присоединением аминокислоты, впоследствии отделяемой, тогда как терминация не сопровождается присоединением или отделением аминокислот. Данные различия, вероятно, возникли в результате длительной эволюции. Функционирование примитивного транслятора, состоявшего из апатитового кристалла с расправленной в его грани одноцепочечной молекулой РНК, наверное, регулировалось более простыми механизмами. Из общих соображений, инициирование и терминация трансляции могли представлять собой последовательность одних и тех же химических превращений, осуществляемых в прямом и обратном направлении.

В силу вышесказанного, обращает на себя внимание удивительная симметрия свойств двух аминокислот – fMet и Sec. В целях удобства, свойства эти расположены в виде таблицы.

Особенности fMet:	Особенности Sec:
Кодон fMet (AUG) совпадает со стартовым кодоном (универсальный код).	Кодон Sec (UGA) совпадает со стоп-кодоном (универсальный код).
У бактерий кодон fMet совпадает с кодоном Met.	У <i>Euplotes crassus</i> кодон Sec совпадает с кодоном Cys.
Кодон AUG прочитывается как fMet (стартовый), если он расположен в начале мРНК, в противном случае он прочитывается как Met (универсальный код).	У <i>Euplotes crassus</i> кодон UGA прочитывается как Sec, если он расположен к концу мРНК (последние 20 кодонов). В противном случае он прочитывается как Cys.
У эукариотов сигналом для прочтения AUG как стартового кодона служит отрезок не кодирующей последовательности нуклеотидов, т.н. «Kozak's consensus sequence», в начале мРНК.	Сигналом для прочтения UGA как Sec служит последовательность SECIS со структурой стебель-петля. У бактерий она располагается в мРНК за соответствующим кодоном UGA, у архей и эукариотов этот элемент расположен вблизи 3'-конца мРНК.
fMet аминоацилируется т.н. иницирующей тРНК (<i>initiator tRNA</i>), отличной от тРНК 20-ти канонических аминокислот.	Sec аминоацилируется специализированной тРНК, т.н. <i>selenocysteine inserting tRNA</i> , отличной от тРНК 20-ти канонических аминокислот.
Биосинтез fMet необычен, завершается после аминоацилирования.	Биосинтез Sec необычен, завершается после аминоацилирования.

Очевидная симметрия свойств двух аминокислот может быть объяснена, если предположить, что ранее механизмы инициирования и терминации трансляции были сходными. Вероятно, fMet использовался как первая аминокислота синтезируемой полипептидной цепи, а Sec – как замыкающая. При расположении в начале мРНК кодон AUG прочитывался как стартовый, а fMet становился первой аминокислотой в цепи, в остальных позициях этот кодон прочитывался как Met. Подобным образом, кодон UGA служил стоп-кодоном при расположении в конце мРНК, и в этом случае Sec присоединялся к полипептидной цепи в качестве замыкающей аминокислоты. В остальных позициях триплет UGA прочитывался как Cys. Сигналом для прочтения каждого из кодонов, соответственно, в качестве стартового и стоп-кодона служили отрезки РНК со структурой стебель-петля. Последовательности нуклеотидов, именуемые «Kozak's consensus sequence» и «SECIS» представляют собой рудименты этих структур. По завершения синтеза обе концевые аминокислоты отделялись от полипептидной цепи, подобно тому, как удаляется fMet после синтеза белков у бактерий.

Сходство процедур инициирования и терминации трансляции не исчерпывается особенностями fMet и Sec, помещёнными в таблице. Обсуждавшиеся выше явления,

именуемые альтернативным инициированием (*alternative initiation*) и *stop-codon readthrough*, например, являются зеркальным отражением друг друга. При альтернативном инициировании трансляция начинается до появления стартового кодона, а в позицию, соответствующую стартовому кодону, вставляется аминокислота. При *stop-codon readthrough* трансляция продолжается после встречи стартового кодона, а в позицию, соответствующую стоп-кодону вставляется аминокислота. С явлением *stop-codon readthrough* ассоциируются структуры стебель-петля, часто также имеющие структуру псевдоузла, расположенные после стоп-кодона, Рис 5-10. Симметричным образом, отрезок РНК со структурой псевдоузла иницирует трансляцию у некоторых вирусов, Рис 5-7.

Ввиду принципиальных отличий процедур инициирования и терминации трансляции у современных организмов, разумно предположить, что отмеченные аналогии указывают на сходство этих процедур в прошлом. В организмах более древних механизмы инициирования и терминации трансляции были проще, чем у современных. Скорее всего, в обеих процедурах был задействован набор сходных химических превращений, при инициировании осуществлявшийся как прямая реакция, а при терминации – как обратная.

Схема становления универсального кода. Все факты и данные об аминокислотах и их кодонах, изложенные в настоящем разделе, могут быть объяснены как результат последовательного эволюционного усовершенствования двух механизмов: механизма инициирования трансляции и механизма её терминации. Предположим, в результате эволюции примитивного транслирующего устройства, описанного в начале раздела, возник транслятор, синтезирующий полипептиды. Изначально число используемых аминокислот было невелико, не больше восьми. Код этого транслятора характеризовался высокой степенью вырожденности, так что каждая аминокислота кодировалась примерно восемью триплетами. Этот транслятор каким-то образом справлялся с синтезом нескольких полипептидов, и этим его функции исчерпывались. В коде этого транслятора не было кодонов, соответствующих инициации и терминации трансляции.

Предположим, на следующем этапе эволюции транслятора были зарезервированы две аминокислоты, *иницирующая* и *закрывающая*, отмечавшие, соответственно, начало и конец трансляции. По завершении трансляции концевые аминокислоты удалялись (как удаляется fMet у современных бактерий), и потому они не входили в состав синтезируемых полипептидов.

Вследствие мутаций, в работе транслятора время от времени случались сбои, и кодирующие последовательности (мРНК или её аналог) прочитывались с ошибками. Трансляция могла начаться раньше кодона начальной аминокислоты, или она могла закончиться позже конечной аминокислоты. При этом соответственно, иницирующая или замыкающая аминокислота оказывалась на удалении от соответствующего конца синтезируемой полипептидной цепи. Соответственно, она не удалялась после завершения трансляции и тем самым оказывалась вовлечённой в синтез полипептидной цепи. Если синтезированный полипептид обнаруживал полезные свойства, мутация фиксировалась. Соответствующая аминокислота утрачивала прежний статус (соответственно, иницирующий или замыкающий) и переходила в разряд протеиногенных. Отметим, описанные выше явления *alternative initiation* и *stop-codon readthrough* в точности воспроизводят предлагаемую схему вовлечения аминокислоты в число протеиногенных, с той разницей, что последние два явления программируются и потому ошибками не являются.

С переходом начальной или конечной аминокислоты в статус протеиногенных возникала необходимость в новой аминокислоте, начальной или конечной. Тем самым создавались предпосылки для расширения общего списка синтезируемых аминокислот. Новая аминокислота в свою очередь вовлекалась в синтез полипептидов, вновь возникала необходимость в ещё одной аминокислоте, и так далее. Расширение списка аминокислот,

тем самым, оказывается следствием несовершенства действовавшей тогда системы инициирования и терминации трансляции. В качестве сигнала, сообщающего о начале трансляции или её завершении, скорее всего, выступала сама молекула аминокислоты, а не её кодон или тРНК. В противном случае молекулы канонических тРНК обнаруживали бы больше отличий между собой. Их можно было бы разбить на три контрастные группы, фигурально выражаясь: (а) стародавние жильцы, (б) подселённые, взошедшие через парадное, и (в) подселённые, проникшие через чёрный ход. Канонические тРНК не распадаются на такие группы, а вот среди аминокислот эти группы просматриваются.

Рассмотрим набор кодонов, используемых в качестве стартовых, при стандартном или альтернативном инициировании у каких-либо организмов: AUG, GUG, UUG, CUG, AUC, AUA, AUU, ACG. Эти восемь кодонов в совокупности соответствуют пяти аминокислотам (в терминах универсального генетического кода):

$$\text{ПРД} = \{\text{Met, Val, Leu, Ile, Thr}\}.$$

Рассмотрим теперь аминокислоты, тем или иным способом ассоциирующиеся со стоп-кодоном. К этой категории мы отнесём аминокислоты, чей канонический код используется в качестве стоп-кодона в каком-либо организме. Сюда же отнесены аминокислоты, в каких-либо организмах кодируемые стоп-кодонами стандартного кода (см. Рис 5-6):

$$\text{ЧХ} = \{\text{Gly, Ser, Arg, Cys, Trp, Sec, Pyl, Tyr, Gln, Leu}\}.$$

Представители группы ПРД на какой-то стадии эволюции побывали в статусе начальной аминокислоты, а представители ЧХ – конечной. Лейцин оказывается единственной аминокислотой попавшей в обе группы. Вероятно, эта аминокислота успела побывать иницирующей для одной группы организмов и замыкающей для других. Оставшиеся восемь аминокислот составляют кружок наиболее подходящих претендентов на стародавность:

$$\text{КОРЕННЫЕ} = \{\text{Phe, Pro, His, Asn, Lys, Ala, Asp, Glu}\}.$$

После нескольких циклов описанного выше алгоритма «вовлечения крайних» должна была возникнуть ситуация, близкая к хаосу. Создаётся впечатление, что последующая эволюция транслятора и его кодов была направлена, главным образом, на преодоление этого хаоса. Во всяком случае, это предположение позволяет объяснить все сведения об особенностях трансляции, обсуждавшиеся выше. Схемы выхода из сложившейся ситуации могли быть различными. Наиболее вероятным представляется выделение некоторой группы аминокислот (подмножество ПРД), которые использовались в качестве иницирующих при нахождении соответствующего кодона в начале мРНК, и которые становились протеиногенными при нахождении того же кодона где-либо ещё на мРНК. Эта схема инициирования, напомним, до сих пор используется у архей и эукариотов. Сходным образом, могла обособиться группа аминокислот (подмножество ЧХ), функционировавших в качестве замыкающих при расположении соответствующего кодона в конце мРНК, и входивших в состав полипептидов для остальных позиций кодона. Все прочие аминокислоты (в их числе все коренные) использовались исключительно как протеиногенные. В целях распознавания иницирующих и замыкающих аминокислот на концах мРНК могли возникнуть специальные структуры, способные распознавать соответствующие аминокислоты и передавать соответствующий сигнал транслятору.

Упомянутые выше образования и структуры, обнаруживаемые на молекулах мРНК, такие как *Kozak's consensus sequence*, сигнализирующая прочтение триплета AUG как стартового кодона в начале мРНК эукариотов, структура псевдоузла иницирующая трансляцию у некоторых вирусов насекомых, (Рис 5-7), последовательность PYLIS со структурой стебель-петля, следующая за триплетом UAG, сигнализирующая, что это кодон Pyl, а не стоп-кодон, последовательность SECIS тоже со структурой стебель-петля, сигнализирующая прочтение триплета UGA как Sec, а не стоп-кодон, Рис 5-8, структуры типа стебель-петля, часто образующие псевдоузлы, ассоциирующиеся с явлением *stop-*

codon readthrough, следующие непосредственно за стоп-кодоном, Рис 5-10, вероятно, представляют собой рудименты и видоизменения молекулярных устройств, ранее сигнализировавших иницирование или остановку трансляции. Устройства (последовательности нуклеотидов), распознающие иницирующие аминокислоты, располагались в начале мРНК, а последовательности, служившие для распознавания замыкающих аминокислот – в конце мРНК. Ранее каждое из этих устройств, видимо, ассоциировалось с определённой аминокислотой. Избирательно с нею связываясь, оно передавало сигнал транслятору об иницировании или о прекращении трансляции. Некоторые из перечисленных устройств до сих пор остаются функциональными, но большинство их редуцировались и превратились в маркеры, распознаваемые белковыми факторами, ныне регулируемыми многократно усложнившийся процесс трансляции.

Вероятно, описанная выше система иницирования и терминации, с двумя семействами аминокислот, наделённых дуальным статусом, хотя и решала задачу регулирования трансляции, но всё же в чёткости и надёжности работы серьёзно уступала современной рибосоме. Время от времени происходили новые сбои в системе регулирования, в результате чего очередная аминокислота утрачивала дуальный статус и переходила в разряд протеиногенных, более не используемых в качестве иницирующих или замыкающих.

Выше упоминалась особенность аминокислот Pyl и Sec, ранее не получившая объяснения. Эти аминокислоты, очевидно позднего происхождения, производят впечатление исчезающих. У селенопротеинов (ферментов, содержащих Sec в активном центре) обнаруживаются гомологи, Sec не содержащие. Та же картина характерна и для белков, содержащих Pyl. Причём обе аминокислоты кодируются стоп-кодонами.

Можно было бы предположить, что Pyl и Sec дополнили список аминокислот как замыкающие аминокислоты, что первоначально они использовались для прекращения трансляции, затем были вовлечены в синтез полипептидов уже в качестве протеиногенных, однако оказались бесполезными, и в силу это теперь они постепенно исчезают. Однако для вовлечения в список протеиногенных аминокислоты должны продемонстрировать полезные свойства, выгода от использования которых превосходит потери, связанные с дополнительными трудностями, возникающими из-за ухудшенного регулирования трансляции. Отсутствие таковых свойств у Pyl и Sec показывает, что механизм смены статуса аминокислот и перехода их в разряд протеиногенных с утратой регулирующей функции мог быть более сложным. Одно из возможных объяснений заключается в том, что к моменту появления Pyl и Sec принципы функционирования транслятора претерпели значительные изменения. В качестве сигнала, регулирующего иницирование и прерывание трансляции, выступала уже не аминокислота, а её тРНК. Поэтому необычный статус Pyl и Sec может быть связан со свойствами их тРНК.

Предположим, вследствие систематических сбоев в системе регулирования трансляции, транслятор эволюционировал в направлении, постепенно изменившем характер регулирующего сигнала. В качестве сигнала, знаменующего иницирование или прерывание трансляции, использовалась теперь не сама аминокислота, а ковалентно с нею соединённая тРНК.

Выше уже несколько раз было упомянуто об отличии иницирующей тРНК (*initiator tRNA*) и тРНК селеноцистеина (*selenocysteine inserting tRNA*) от всех других молекул этого класса. Предположим, из всех аминокислот, принимающих участие в иницировании, выделилась одна – Met, и за ней был закреплён дуальный статус. Была также выделена одна аминокислота из числа замыкающих, Ser или Sec, и она тоже сохранила дуальный статус. Все остальные аминокислоты стали протеиногенными и прямого участия в регулировании трансляции более не принимали. В отличие от прежнего механизма регулирования, носителем статуса стали не аминокислоты, две соответствующие молекулы тРНК. Вероятно, иницирующая тРНК взаимодействовала со специальной нуклеотидной последовательностью в начале мРНК, остатком которой является

современная «Kozak's consensus sequence», и это служило сигналом начала трансляции. Сходным образом, тРНК селеноцистеина (снаряжённая серином или цистеином) взаимодействовала с неким аналогом последовательности SECIS, и это служило сигналом прекращения трансляции. В отсутствие указанных последовательностей на мРНК те же кодоны считывались другими молекулами тРНК (каноническими), но снаряжающие их аминокислоты оставались теми же.

Новый способ регулирования трансляции был, вероятно, лучше прежнего, но ошибки всё же случались. Поэтому особый статус выделенных двух молекул тРНК был усилен модифицированием присоединённой к ним аминокислоты. Met был модифицирован с образованием fMet, а Ser (или Cys) был модифицирован с образованием Sec. Усиливался статус тРНК, а не аминокислоты, поэтому модифицирование производилось уже после аминоацилирования, как то имеет место поныне (см. выше обсуждение данных о fMet и Sec). Модифицирование аминокислоты прежде аминоацилирования могло бы привести к тому, что модифицированная аминокислота присоединится к канонической тРНК, и регулирование трансляции тем самым нарушилось бы.

Очевидно, приведённая схема возникновения и функционирования fMet и Cys и ассоциирующихся с ними тРНК полностью объясняет данные об этих двух аминокислотах, собранные в виде таблицы выше в данном разделе (стр.97). В частности получает объяснение тот факт, что у *Euplotes crassus* кодон UGA прочитывается как Sec, если он расположен ближе к концу мРНК (последние 20 кодонов). В остальных позициях UGA прочитывается как Cys. Вероятно это небольшое видоизменение описываемого здесь механизма терминации. Изначально триплет UGA прочитывался как Sec при расположении его в конце мРНК, а во всех остальных позициях этот же триплет прочитывался как Cys. При прочитывании UGA как Sec использовалась специализированная *selenocysteine inserting tRNA*, распознававшаяся транслятором как сигнал терминации. В остальных случаях использовалась каноническая тРНК цистеина. Тем самым явления, наблюдаемые в *E. crassus* совпадают с описанным нами механизмом терминации трансляции с двумя отличиями: Sec более не является замыкающей аминокислотой (хотя триплет UGA по-прежнему используется как стоп-кодон универсального кода), и UGA прочитывается у *E. Crassus* как Sec не только в последней позиции мРНК, а примерно в двадцати последних позициях. Вероятные причины этого обсуждаются ниже.

Переход от прежнего механизма регулирования трансляции, основанного на двух семействах аминокислот, наделённых дуальным статусом, к новому, в коем особым статусом наделялись две молекулы тРНК, вероятно был постепенным. Выше упоминалась аминокислота Pyl, во многом сходная с Sec. Подобно Sec, напомним, Pyl кодируется одним из стоп-кодонов универсального кода – триплетом UAG. Данный триплет прочитывается рибосомой как Pyl при наличии последовательности PYLIS со структурой стебель-петля, расположенной после UAG. Главное отличие Pyl от Sec (с точки зрения перспектив использования их в качестве замыкающих аминокислот) в том, что синтез Pyl заканчивается до аминоацилирования (а не после), и тРНК у Pyl, хотя и отличается явно от канонических тРНК, но всё ж не так сильно как *selenocysteine inserting tRNA*. Вероятно, Pyl использовался в качестве замыкающей аминокислоты непосредственно перед Sec, в период, когда прежний способ регулирования трансляции постепенно заменялся новым, и особенности его тРНК возникли как адаптация в ситуации, когда прежний способ регулирования (когда сигналом служит аминокислота) ещё не упразднён, а новый (в котором сигналом служит тРНК) не вполне оформился.

По всей видимости, использование иницирующей тРНК в качестве основного фактора, регулирующего иницирование трансляции, оказалось успешным, и этот механизм сохранился в процессе эволюции. Использование иницирующей тРНК создало предпосылки для унификации стартовых кодонов, и их число уменьшилось до трёх у архей и бактерий и до одного у эукариотов. Упомянутый выше факт, что при

альтернативном иницировании, когда в качестве стартового использован кодон, отличный от AUG, считывание стартового кодона, тем не менее, осуществляется иницирующей тРНК (хотя её антикодон комплементарен AUG и поэтому не комплементарен используемому кодону), и синтез полипептидной цепи по-прежнему начинается с Met, свидетельствует об успехе использования иницирующей тРНК (а не соответствующей аминокислоты) в качестве регулирующего фактора трансляции. Само явление альтернативного иницирования, видимо, сохранилось лишь потому, что позволяет модифицировать синтез соответствующих белков, транслируя разными способами один и тот же ген. Это сравнительно редкое явление служит напоминанием об эпохе, когда стартовых кодонов было существенно больше, нежели теперь.

В противоположность иницирующей тРНК, использование *selenocysteine inserting tRNA* в качестве фактора, останавливающего трансляцию, успеха не имело. Соответствующая аминокислота, Sec, была в очередной раз вовлечена в синтез полипептидов и, утратив статус замыкающей, перешла в разряд протеиногенных аминокислот. Ассоциирующаяся с Sec *selenocysteine inserting tRNA* тоже утратила особый статус регулирующего устройства и далее использовалась только для считывания кодона, соответствующего Sec, при синтезе селенопротеинов, подобно остальным молекулам тРНК. В результате механизм остановки трансляции был изменён в очередной раз.

К моменту сбоя в системе прерывания трансляции, приведшего к вовлечению Sec в синтез полипептидов, трансляция сама по себе была уже освоена в степени совершенства, позволявшей производить белки достаточно сложной структуры. Поэтому в новом механизме в качестве фактора, останавливающего трансляцию, использовалась не тРНК, а один или два белковых фактора, именуемых *release factors*. Как упоминалось выше, молекулы этих факторов имитируют молекулы тРНК, они распознают стоп-кодона стандартного кода, однако их использование рибосомой не сопровождается присоединением аминокислоты к синтезируемой полипептидной цепи.

Созданием *release factors*, позволяющим прекращать трансляцию без присоединения аминокислоты к полипептиду, была поставлена точка в длительной истории поисков эффективных путей иницирования и остановки трансляции. Прекратилось и вовлечение новых аминокислот в синтез полипептидных цепей.

Остаётся неясным, как осуществился переход от прежнего механизма прекращения трансляции, с присоединением замыкающей аминокислоты к синтезируемой цепи, к новому, с участие *release factors*, не сопровождающимся присоединением аминокислоты. Вероятно, переход осуществлялся постепенно и два механизма прерывания трансляции какое-то время сосуществовали. Многочисленные примеры нестандартных генетических кодов, в которых либо канонический стоп-кодон кодирует аминокислоту – либо канонический кодон аминокислоты используется как стоп-кодон (см. Рис 5-6), могли возникнуть в процессе замены прежнего способа прерывания трансляции новым. Ввиду сосуществования двух путей прерывания трансляции, они, вероятно, до некоторой степени были взаимозаменяемы. Возможно, именно взаимозаменяемостью двух способов прерывания трансляции и объясняются характерные для инфузорий и митохондрий странности в прочтении стоп-кодона, когда филогенетически удалённые виды обнаруживают идентичные отклонения от универсального генетического кода, сопровождающиеся к тому же сходными изменениями соответствующих *release factors* (по крайней мере, у инфузорий), тогда как более родственные им виды могут использовать универсальный код.

Изложенная здесь схема возникновения и эволюции генетического кода носит предварительный характер. Она устанавливает взаимосвязи между разнообразными явлениями, обнаруженными при исследовании особенностей трансляции, хотя причины наблюдаемых изменений не всегда могут быть угаданы с достаточной точностью. Возможно, с привлечением дополнительных сведений, предлагаемая схема будет отредактирована или пересмотрена. Будучи предварительной, предлагаемая схема всё же

показывает, что имеющиеся данные об особенностях трансляции и генетического кода могут быть объяснены как результат эволюционного совершенствования единственного транслирующего устройства. Тем самым, история генетического кода – это история кода, используемого рибосомой. В то же время, развитые нами ранее представления о возникновении трансляции приводят к выводу о сосуществовании нескольких трансляторов, каждый со своим кодом, на более ранних этапах развития жизни. Ниже сделана попытка понять, почему из всего множество трансляторов в процессе эволюции сохранился лишь один.

5.5.5.3 «Триумфальное шествие» рибосомы.

Корабль, на котором отплыл Тесей с молодыми людьми и счастливо вернулся, был тридцативесельный. Афиняне берегли его до времен Деметрия Фалерского, причем отрывали старые доски и заменяли их другими, крепкими, вследствие чего даже философы, рассуждая об увеличении размеров существующего в природе, спорили, приводя в пример этот корабль, – одни говорили, что он остается тем же, чем был раньше, другие – что его более не существует.

Плутарх. Тесей и Ромул.

Вопрос об эволюционном пути организма, в котором сосуществуют и взаимодействуют несколько трансляторов, сложен, и мы не можем подробно его здесь рассматривать. Из общих соображений трудно предугадать вероятное развитие событий. Может ли, например, транслятор демонстрировать стратегию, похожую на проявление альтруизма, когда белки, производимые одним транслятором, используются для усовершенствования другого, и первый в результате оказывается менее совершенным и утрачивается? Должны ли коды, используемые двумя сосуществующими трансляторами, в ходе эволюции постепенно сближаться? Или же должны иметь место критические явления, подобные фазовому переходу, так что изначально близкие коды будут сближаться, а изначально более удалённые – удаляться всё более? Наш подход к проблеме будет сугубо интуитивным.

Интуитивно, наличие нескольких трансляторов в одном организме является положительным фактором, способствующим успешной адаптации, при условии, что имеет место дублирование их функций. Ситуация, когда один транслятор способен взять на себя функции другого, многократно облегчает эволюционное усовершенствование самих трансляторов. При наличии лишь одного транслятора, мутации, приводящие к изменениям в его работе, с более высокой вероятностью приведут к гибели организма, поскольку нарушенным оказывается синтез сразу всех производимых белков. Более высокие темпы эволюции трансляторов, в свою очередь, позволяют соответствующему организму быстрее обзавестись белками лучшего качества, и это даст ему возможность лучше и быстрее приспособиться к условиям среды. Тем самым, при наличии в организме двух трансляторов сопоставимых по степени технического совершенства, коды которых изначально близки, эволюция должна пойти в направлении дальнейшего сближения кодов. При близости кодов, до полного совпадения, один и тот же ген может быть транслирован различными трансляторами. При этом процесс отбора будет способствовать сохранению в одном организме двух или более транслирующих устройств, кодируемых различными генами.

Представим себе теперь противоположную ситуацию, когда, в силу тех или иных причин, в одном организме оказалось два транслятора сильно отличающихся и кодами, и своими техническими возможностями. В процессе эволюции такого организма белки, производимые менее совершенным транслятором, один за другим, будут заменены

белками, произведёнными более совершенным транслирующим устройством. Более совершенный транслятор, в большей степени способствуя процветанию организма-обладателя, постепенно возьмёт на себя функции остальных трансляторов, уступающих ему в степени совершенства производимых белков. Менее совершенные в результате будут утрачены, а используемые ими апатитовые кристаллы исчезнут или превратятся в стяжения фосфатов, подобные волютину, непосредственно в трансляции не задействованные. Фигурально выражаясь, выбор в пользу более совершенного транслятора совершается из соображений сиюминутной выгоды, хотя в более отдалённой перспективе эта стратегия может оказаться проигрышной. Сколь бы ни был совершенен избранный транслятор, дальнейшее его усовершенствование эволюционным путём затруднено ввиду отсутствия транслятора, способного дублировать его функции.

Наблюдаемый факт наличия в природе лишь одного транслятора – рибосомы – получает объяснение, если предположить, что в процессе эволюции более или менее стабильно в течение значительного отрезка времени может поддерживаться одна из двух ситуаций. Первая заключается в сосуществовании двух и более трансляторов (кодируемых разными генами), быстро эволюционирующих, но обладающих сходными техническими возможностями и использующих сходные или идентичные коды. Вторая стабильная ситуация – это наличие лишь одного транслятора в организме, и в этом случае эволюция транслятора оказывается замедленной.

Предположим, на некоторой стадии развития жизнь развивалась по первому сценарию. Имелись группы организмов, обладающих несколькими трансляторами примерно равных возможностей, и трансляторы эти быстро совершенствовались. Различные группы организмов при этом обладали трансляторами разной степени совершенства, и поэтому скорости эволюции разных групп были различны.

Эволюционное усовершенствование трансляторов, обеспечивающее постепенное усовершенствование белковых молекулярных машин, рано или поздно должно было привести к появлению новых форм паразитизма. Трудно сказать, как в точности они выглядели. До наших дней эти формы не сохранились. По аналогии с современными вирусами, можно предположить, что это была некоторая форма подвижной РНК или ДНК, – генный материал, помещённый в белковый контейнер (аналог капсиды). По аналогии с современными вирусами, кодирующими полимеразы, можно предположить, что эти элементы кодировали транслирующее устройство. Обладание собственным транслятором было одним из условий успеха паразитической стратегии в условиях, когда организмы различались типом задействованных трансляторов, и потому кодировали наследственную информацию в разных генетических кодах. Эти формы подвижных генетических элементов не кодировали полимеразы, потому что молекулярные приспособления этого типа возникли позднее. Вероятно, они использовали апатитовые кристаллы клетки, служившей объектом паразитизма, для копирования своих генов. После появления полимераз и упразднения технологии копирования генов стемпингом, как морально устаревшей, эти формы подвижных генетических элементов должны были исчезнуть или видоизмениться.

Возникновение новой формы паразитизма – подвижных генетических элементов, использующих белки, стало результатом прогресса технологии трансляции. Поэтому возникнуть подобные формы паразитизма должны были в среде организмов, производивших белки наивысшего качества. Тем самым, возникшие паразиты были оснащены наилучшим из трансляторов, существовавших на тот момент. Вероятно, клетки организмов, на которых паразитировали и в среде которых возникли обсуждаемые формы паразитизма, сами содержали более одного транслятора. Однако кодирования лишь одного из наличествующих трансляторов было достаточно для успешной паразитической стратегии.

Дальнейшее очевидно. Заражая различные группы организмов, вновьявленные паразиты распространили среди них новый транслятор. Объекты паразитизма обладали

трансляторами, технически уступающими новоприобретённому, использующими иные генетические коды. Поскольку паразиты снаряжались лишь одним транслятором, возникающая ситуация, как разъяснено выше, оказывалась нестабильной. Организмы, получившие в обладание транслятор новейшего образца, в последующей эволюции следовали нашему второму сценарию. Исходные трансляторы организмов были утрачены, а кодируемые ими белки были заменены новыми, лучшего качества. Новейший транслятор, получив всеобщее распространение, оказался единственным приспособлением такого рода, и скорость его эволюции замедлилась.

Закрывающая в себе парадокс легенда о корабле Тесея, пересказанная Плутархом, в новое время обсуждалась также Гоббсом и Локком. Джон Локк, как известно, размышлял о сношенном любимом носке, в коем образовалась прореха. Можно ли считать носок тем же самым носком после штопки, когда дыра заделана? Будет ли носок тем же носком, если после многократных штопок старые нитки полностью заменить новыми? Остаётся догадываться, как вышеназванный мыслитель отнёсся бы к предложению себя самоё уподобить вышеозначенному носку.

Обратимся ещё раз к филогенетическому древу РНК малой субъединицы рибосомы, помещённому на Рис 5-2. В свете излагаемых представлений о возникновении эволюции и унификации процедуры трансляции, диаграмма на Рис 5-2 может быть истолкована как отражение истории *расселения* рибосомы (или транслятора, впоследствии развившегося в рибосому) и её последующих изменений. Возникнув в организме предка археи, гены, кодирующие рибосому, тРНК и все нужные факторы трансляции были занесены с паразитами в организмы предков иных архей, а затем и в организмы предков бактерий. В ходе последующей эволюции собственные белки организмов, один за другим, заменялись новыми, подобно сгнившим доскам корабля Тесея. Собственные трансляторы, менее совершенные, постепенно ими утрачивались.

Аналогия с штопанным носком лучше передаёт характер становления современных организмов, нежели легенда о корабле Тесея. Новые доски, используемые в ремонте корабля, были точной копией утрачиваемых, тогда как новые белки, производимые рибосомой, заменяли место прежних поскольку отличались от них в лучшую сторону. Нитки в штопке тоже могут отличаться от исходных и составом, и цветом. Они могут оказаться прочнее, иным может быть самый способ сплетения их в образуемой ткани. Так или иначе, мы не можем называть бактерии бактериями не впадая в парадокс. Филогенетическое древо рибосомы служит иллюстрацией истории развития и расселения рибосомы. Филогенетические деревья, построенные для различных белков, рибосомой синтезируемых, отражают её же. Мы, вероятно, никогда не и узнаем, из каких белков делались организмы до наступления эры, которую можно назвать «триумфальным шествием рибосомы».

Единообразие транслирующего устройства, наступившее после «триумфального шествия рибосомы», создало предпосылки для ещё одного явления: горизонтального переноса генов, кодирующих белки. Ввиду стремительного расселения рибосомы, организмы филогенетически удалённые, ранее использовавшие разные трансляторы с различающимися кодами, получили возможность транслировать гены друг друга. Способность обзавестись новым геном и успешно его транслировать, вероятно, стала важным преимуществом, одним из факторов отбора, в свою очередь способствующая дальнейшему распространению рибосомы. Именно с горизонтальным переносом генов и следует, видимо, связывать факт универсальности генетического кода рибосомы. Единство кода составляет одно из условий успешного заимствования генов. Поэтому в ходе последующей эволюции код не менялся, или же изменения происходили синхронно, во всех сосуществующих группах организмов, вовлечённых в обмен генами.

Предположение о связи единообразия генетического кода с горизонтальным переносом генов согласуется также с тем фактом, что неканонические кодоны часто обнаруживаются у органелл – митохондрий, гидрогеносом и хлоропластов, Рис 5-6. Установлено, что эти

органеллы имеют эндосимбиотическое происхождение. Митохондрии и гидрогеносомы являются потомками бактерии, предположительно, родственной риккетсиям, а хлоропласты происходят от цианобактерий. Для эндосимбионта, клетки бактерии, обитавшей внутри клетки эукариота, процесс обмена генами с остальными бактериями был затруднён. Клетка хозяина предоставляла дополнительную защиту от паразитировавших на бактериях подвижных генетических элементов (фагов, плазмид или иных форм, до нашего времени не сохранившихся). В результате процесс становления генетического кода в них осуществлялся с некоторым опозданием, и замена прежнего способа инициирования и прерывания трансляции новым осуществлялась не совсем так, как у остальных бактерий. Если высказанное предположение верно, тогда возникновение эукариотов должно было предшествовать появлению современной версии универсального генетического кода.

Одна из особенностей эволюции при наличии лишь одного транслятора, как отмечалось выше, состоит в замедлении эволюции самого транслятора. Вероятно, эволюция рибосомы замедлилась после того, как она получила повсеместное распространение. В итоге рибосома, преобразовавшая мир, наполнившая его многоразличными белковыми молекулярными устройствами непревзойдённого совершенства и изящества, сама мало изменилась со времён, когда белки производились примитивными трансляторами. Монструозный облик рибосомы – хитросплетения РНК, инкрустированные тут и там небольшими молекулами белков, – вероятно, даёт представление о том, как выглядели типичные молекулярные устройства, производимые с использованием примитивных трансляторов.

5.5.5.4. Миниатюризация трансляторов.

Дизайн транслирующего устройства, в виде апатитового кристалла с расправленной в нём молекулой одноцепочечной РНК, был несколько громоздким, поскольку длина используемого кристалла должна была соответствовать длине транслируемой молекуле мРНК. В разделе 5.7 показано, что на определённой стадии эволюции организмами был освоен целенаправленный синтез собственных апатитовых кристаллов. Явление это мы будем называть веригиношением. Вследствие веригиношения размер кристалла-основы становится одним из решающих факторов отбора. Ввиду необходимости одновременно транслировать большое количество белков, как то имеет место в современных организмах, соображения экономии вещества, которое Дарвин недаром называл «столь ценным известковым фосфатом» вкупе с необходимостью уменьшить общий объём, занимаемый трансляторами, должны были приводить к появлению молекулярных устройств, выполнявших те же функции, но меньших размеров. Иначе говоря, дизайн транслирующего устройства должен был эволюционировать в направлении миниатюризации.

Исходный дизайн, когда молекула мРНК (или её аналог) фиксирована в основе, а рибозимы (аналоги тРНК) «пришвартовываются» антикодонами к различным участкам мРНК (кодонам), был заменён новым, подобным современному, в котором молекула мРНК продёргивалась через транслятор. Такой дизайн позволил многократно уменьшить используемый апатитовый кристалл, приблизив его размеры к размерам задействованных в трансляции рибозимов.

Вероятно, участвующие в трансляции рибозимы располагались с двух сторон используемого миниатюрного кристалла. В ходе дальнейшего уменьшения размеров кристалла, когда он редуцировался до «горстки атомов», рибозимы по обеим его сторонам сошлись воедино, образовав две субъединицы современной рибосомы. Напомним, рибосома диссоциирует на две субъединицы, если концентрация катионов Mg^{2+} в растворе недостаточно велика. По всей видимости, несколько катионов Mg^{2+} , удерживающие две субъединицы вместе, – это всё, что осталось от апатитового кристалла, некогда служившего основой при трансляции.

5.6. Возникновение мембраны и мобильных генетических элементов.

It seems difficult (if not impossible) to imagine the early development of an elaborated metabolism in the absence of cellular confinement.

Patrick Forterre

Стемпинг – это процесс синтеза полинуклеотидов, осуществляемый на поверхности кристаллов апатита. При возникновении мира РНК и на ранних этапах его развития этот процесс мог быть организован как синтез двухцепочечной РНК из мононуклеотидов *de novo* или как репликация РНК с использованием мононуклеотидов и одноцепочечной РНК-матрицы. В обоих случаях накопление продукта реакции могло привести к обволакиванию кристалла, используемого в качестве основы, полимерной плёнкой, состоящей из РНК или её аддуктов. Такая плёнка должна быть проницаемой для молекул воды, растворённых в ней неорганических ионов и небольших молекул. Однако она могла оказаться непроницаемой для каких-то растворимых в воде продуктов молекулярного метаболизма. В последнем случае под плёнку осмотическим давлением должна была нагнетаться вода, и плёнка вздувалась пузырьком с образованием внутреннего пространства, отъединённого от внешней среды. Постепенное накопление метаболитов должно было приводить к дальнейшему возрастанию осмотического давления. По достижении определённого критического давления пузырь вскрывался и опорожнялся во внешнюю среду. Содержащиеся в пузыре молекулы РНК высвобождались для колонизации новых кристаллов.

Многочисленное повторение вышеописанного процесса, возникшего самопроизвольно, должно было привести к выработке молекулярных приспособлений, регулирующих проницаемость мембраны, длительность цикла и т.п. Чередование вздутий и разрывов подобного пузыря могло в процессе эволюции постепенно сделаться тем, что уже можно назвать жизненным циклом, сродни жизненному циклу современных вирусов.

С появлением примитивной мембраны, огораживающей используемый для репликации кристалл апатита, появляется возможность деления реплицирующихся рибозимов на «своих» и «чужих». «Свои» становятся симбионтами, объединяясь ради синтеза новых нуклеотидов с последующим использованием их для воспроизводства путём репликации РНК. В последующем, такие молекулы должны были создать более или менее устойчивые объединения, ведущие более или менее осёдлый образ жизни. Среди «чужих» тем временем могли сформироваться рибозимы, не обременявшие себя заботами о синтезе нуклеотидов, совершенствовавшиеся в искусстве *отобедать нашерамыжку*. Могли возникнуть и подвижные генетические элементы, вступающие в симбиотические взаимоотношения с «осёдлыми» обитателями отъединённых мембраной пространств.

В последующей эволюции объединения «осёдлых» молекул, отгораживающихся полупроницаемой мембраной от внешнего мира, могли развиваться в клеточные формы жизни. Примитивные мембраны, состоящие из РНК или РНК-аддуктов, были постепенно заменены на мембраны современных клеток. Тем не менее, РНК-аддукты или их реликты могли сохраниться в мембранах современных клеток. Потомки подвижных форм РНК, паразитирующих на объединениях «осёдлых» молекул или вступающих с ними в симбиотические взаимоотношения, могли сохраниться до наших дней как мобильные генетические элементы. Ниже приводятся сведения о содержащих фрагменты РНК молекулах в мембране бактерий, возможно, представляющих собой реликты древнейших мембран, а также некоторые данные об интронах группы I и группы II в геномах бактерий, вероятно, происходящих от мобильных генетических элементов из мира РНК.

5.6.1. Хопаноиды бактериальных мембран.

В современных организмах вхождение фрагментов РНК в клеточную мембрану описано только для бактерий, и только в виде хопаноидов. Хопаноидами (hopanoids) называют необычный класс полициклических липидов (точнее, пентациклических тритерпеноидов), производимых некоторыми бактериями (главным образом α -proteobacteria). По структуре они напоминают стеролы, играющие важную роль в регулировании свойств мембран эукариотов, но имеют на одно кольцо больше, Рис 5-11.

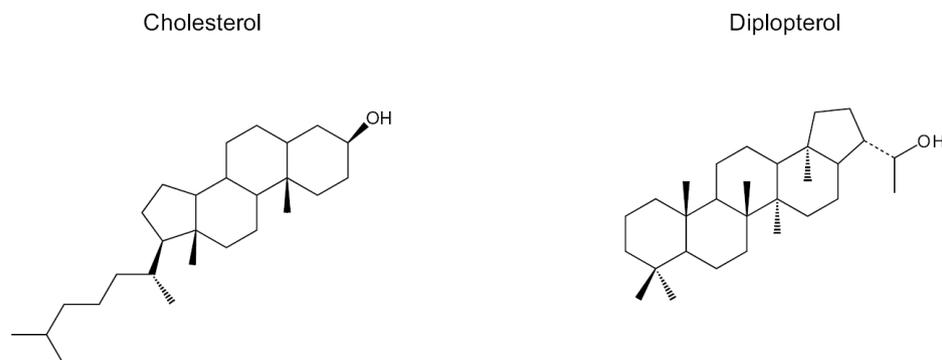


Рис 5-11. Сравнение структуры хопаноидов (на примере диплоптерола, справа) и стеролов (на примере холестерина, слева).

Функции хопаноидов в клетках бактерий (по крайней мере, те, что известны) также аналогичны функциям стеролов эукариотов. Плоские молекулы хопаноидов встраиваются между молекулами билипидного слоя клеточной мембраны, регулируя их стабильность, проницаемость и механические свойства, [673]. Выделенные из различных бактерий хопаноиды обнаруживают необычайную вариативность в строении боковой цепи. Хотя причины и физиологическое значение этих отличий пока не были поняты, их используют в качестве биомаркеров биологической активности бактерий, [674].

Хопаноиды обнаруживают необычайную устойчивость к воздействию щелочей, кислот и высокой температуры. Они не разлагаются и сохраняются в осадочных породах, и это позволяет использовать хопаноиды в качестве биомаркеров жизнедеятельности бактерий в вымерших биотах. Широкую известность приобрело обнаружение хопаноидов в сланцах архейского кратона Pilbara в Австралии, возрастом 2700 млн. лет.

В 1985 г. авторы [675] выделили из пурпурной несерной бактерии *Rhodospseudomonas acidophila* необычный хопаноид – аденозилхопан, Рис 5-12.

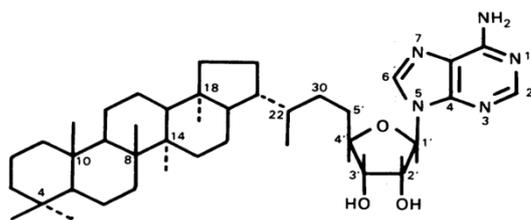


Рис 5-12. Аденозилхопан.

Затем в работе [11] было высказано предположение, что данное соединение представляет собой реликт мира РНК. Как полагают авторы, фрагменты РНК, ковалентно связанные с терпеноидами, образовывали полярную часть амфифильных липидных мембран древнейших организмов. Верна эта гипотеза или нет, судить трудно, однако сравнительно недавно в работе [676] было обнаружено косвенное её подтверждение – было показано, что аденозилхопан действительно является очень древним соединением, имевшимся уже в общем предке всех бактерий.

Авторы [676] исследовали механизм образования боковой цепи хопаноидов в бактериях. Ими были идентифицированы гены, ответственные за первые две стадии этого процесса в бактерии *Metilobacterium extorquens*. Создавая искусственные мутации в геноме бактерии и анализируя изменения в метаболизме, авторы установили, что сначала диплоптен соединяется с S-аденозилметионином с образованием аденозилхопана, а затем имеет место отщепление аденина от аденозилхопана, Рис 5-13.

Далее, проведя филогенетический анализ отождествлённых генов, ответственных за образование боковой цепи хопаноидов, авторы пришли к выводу, что предложенный ими механизм универсален. Образование боковой цепи во всех бактериях включает аденозилхопан как промежуточное соединение, с последующим отщеплением аденина. Индивидуальные особенности боковой цепи хопаноидов из различных бактерий приобретаются на более поздних стадиях. Согласно авторам, универсальность механизма свидетельствует, что аденозилхопан несомненно присутствовал в организме общего предка всех бактерий.

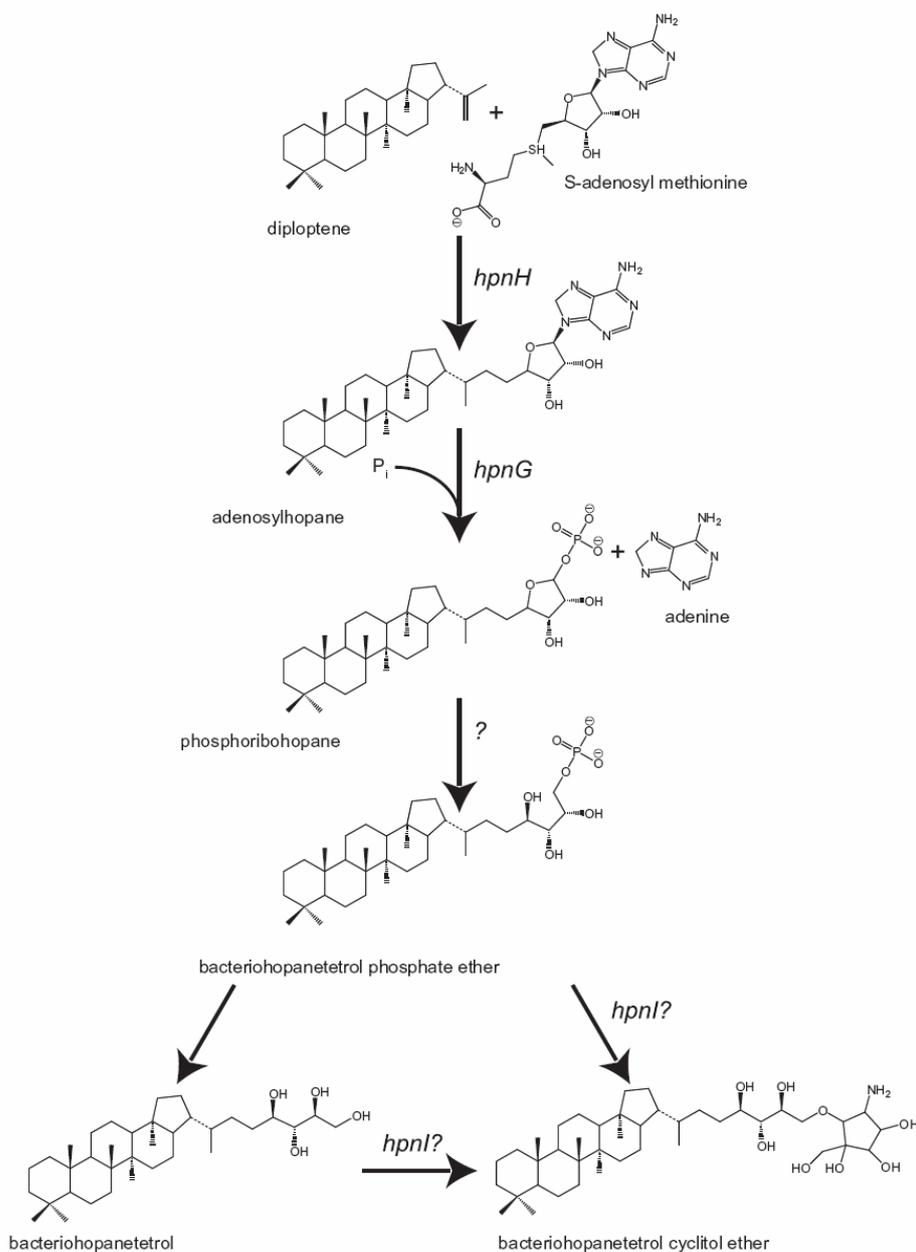


Рис 5-13. Первые две стадии биосинтеза боковой цепи хопаноидов: фермент, обозначенный как *hpnH* присоединяет S-аденозилметионин к диплоптенту с образованием аденозилхопана. Затем аденин удаляется ферментом *hpnG*. Из работы [676].

Древность аденозилхопана согласуется с предположением авторов [11] о том, что мембраны древнейших организмов состояли из аддуктов РНК и терпеноидов. Важно отметить, что согласно развиваемым нами положениям, изначально, эта мембрана не образовывала мицеллы – она обволакивала кристалл апатита.

Присутствие хопаиноидов в мембранах бактерий и отсутствие их в мембранах архей – это лишь один из многих примеров отличий в строении липидов в мембранах архей от липидов в мембранах бактерий и эукариотов. Эти отличия рассматриваются как признак раннего расхождения эволюционных орбит архей и бактерий, ещё до появления у них современных мембран, [777-779]. В свете положений, изложенных выше, в разделе 5.4, соотносящих возникновение предков бактерий с возникновением нового типа жизненных циклов, основанного на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, отличия в строении липидных мембран архей и эукариотов означают, что ДНК возникла ещё до появления современных клеточных мембран. Столь раннее возникновение ДНК согласуется с высказанным нами ранее предположением, что восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов осуществлялось с использованием каталитической активности апатита.

5.6.2. Интроны группы I и группы II в геномах предков бактерий.

*Помнишь [душа моя Тряпичкин], как мы с тобой
бедствовали, обедали нашерамыжку и как один раз было
кондитер схватил меня за воротник по поводу съеденных
пирожков на счет доходов аглицкого короля?*

Николай Гоголь

Среди современных мобильных генетических элементов почти все кодируют собственные полимеразы, за исключением интронов группы I, интронов группы II и небольших плазмид. При этом их жизненные циклы, как правило, имеют мало общего с жизненным циклом хозяина. До появления *bona fide* полимераз, воспроизводство мобильных генетических элементов должно было осуществляться стемпингом хозяйского апатита. Последнее предполагает, что жизненный цикл древнейших мобильных генетических элементов был так или иначе «встроен» в жизненный цикл хозяина. Ниже сделана попытка проинтерпретировать под таким углом зрения данные об интронах бактерий, исходя из предположения, сделанного ранее (см выше, раздел 5.4.1), что жизненный цикл предков бактерий основывался на чередовании транскрипции и обратной транскрипции.

Многие современные интроны группы I и группы II содержат открытую рамку считывания (ORF), кодирующую белки, которые сообщают интронам свойство мобильности. Однако все известные механизмы мобильности обязательно используют хозяйские системы репарации двухцепочечной ДНК. Поскольку такие механизмы не могли функционировать до появления двухцепочечной ДНК, их обсуждение будет отложено до раздела 5.10, в котором, в частности, предложена модель возникновения репликации ДНК и модель возникновения механизмов мобильности у интронов группы I и группы II.

Интроны группы I. Закономерности распределения интронов в геномах бактерий обсуждаются в обзорной работе [717]. Согласно выводам авторов, в бактериях обнаруживается два контрастных семейства интронов группы I: интроны инкорпорированные в хромосомы и интроны входящие в состав фагов. Интроны в хромосомах никогда не прерывают последовательностей, кодирующих белки. Они всегда обнаруживаются в последовательностях, кодирующих четыре тРНК, и в очень редких

случаях – в последовательностях, кодирующих рибосомную РНК. В противоположность им, интроны фагов всегда прерывают последовательности, кодирующие белки.

Ещё одна закономерность, обнаруженная авторами [717], подтверждаемая также в обзоре [684], состоит в том, что сплайсинг интрона, инкорпорированного в хромосому, осуществляется при участии белка, кодируемого хозяйским геномом. Сам белок, способствующий сплайсингу, т.е. проявляющий активность матуразы, может иметь различную природу: рибонуклеаза, тирозил-тРНК-синтетаза, использующий энергию АТФ шаперон и др. Все они кодируются хозяйской хромосомой и, помимо сплайсинга, выполняют и другие функции в клетке. У интронов фагов закономерность иная: они обычно содержат ORF, и сплайсинг обычно осуществляется белком, кодируемым ORF того же интрона.

Ещё одна закономерность, подмеченная авторами [717], состоит в том, что интроны группы I бактерий с ORF, кодирующими самонаводящиеся эндонуклеазы, за редкими исключениями, ассоциируются с фагами и рассекают кодирующие последовательности белков. Причём для таких интронов характерно внедрение в высококонсервативные участки генов белков, так или иначе участвующих в метаболизме ДНК. Иногда интроны, содержащие ORF, кодирующую самонаводящуюся эндонуклеазу, разбивают гены в хромосомах бактерии (а не фага). При этом разбиваемый ген тоже кодирует белок, участвующий в метаболизме ДНК (рекомбиназа А, рибонуклеотид редуктаза, [780,781]).

Феномен внедрения интронов с самонаводящимися эндонуклеазами в гены белков, участвующих в метаболизме ДНК, будет разъяснён далее, в разделе 5.10. Здесь это явление упоминается в целях полноты изложения. Остальные две особенности распределения интронов группы I в бактериях могут быть поняты исходя из высказанных нами ранее предположений об использовании их при стемпинге (раздел 5.1.2) и трансляции (раздел 5.5.2).

Связь интронов группы I с тРНК и рибосомной РНК уже обсуждалась выше (раздел 5.5.3). Это явление, напомним, было объяснено как наследие времён, когда интрон группы I использовался в трансляции. Предположительно, этот интрон использовался для катализа реакции аминокислотирования (или обратной ей), циркулируя в процессе трансляции между тРНК и рибосомной РНК. Там же, в разделе 5.5.3 высказано предположение, что участвующие в трансляции интроны группы I кодировались как участки генов тРНК, из которых они затем (после транскрипции ДНК, поскольку речь в данном случае идёт о предках бактерий) удалялись аутосплайсингом. Впоследствии те же интроны могли быть использованы предками бактерий для каталитического образования фосфодиэфирных связей при стемпинге, поэтому каталитическая активность интронов была сохранена. (Хотя интрон группы I катализирует различные реакции, катализ всегда осуществляется с использованием одного и того же активного центра.)

Закономерность, состоящая в том, что сплайсинг интронов, инкорпорированных в хромосому бактерий, осуществляется с использованием матураз, кодируемых клеточным геномом (а не ORF интрона) тоже получает рациональное объяснение в предположении об использовании интронов группы I при стемпинге. В самом деле, интроны кодируются клеткой, используются клеткой, тем самым и сплайсинг их сплайсинг осуществляется в интересах клетки, поэтому нет необходимости кодировать матуразу в ORF интрона.

Для объяснения особенностей интронов группы I, ассоциирующихся с фагами, предположим, что предки бактерий служили объектом паразитизма для каких-то мобильных генетических элементов, подобных современным фагам. Назовём их *протофагами*. Жизненный цикл протофагов, скорее всего, был основан на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, как и у их хозяев. Подобно своим хозяевам, протофаги, по крайней мере, одну из двух этих реакций осуществляли стемпингом апатитовой основы. Для стемпинга ими использовался хозяйский апатит. Подобно современным фагам, успех захватнической стратегии протофагов во многом определялся быстротой, с которой они осуществляли свой жизненный цикл. Поэтому представляется

разумным предположить, что протофаги кодировали собственный интрон группы I, используя его для каталитического соединения нуклеотидов фосфодиэфирными связями при стемпинге. Для ускорения сплайсинга интрона они, подобно современным фагам, кодировали соответствующую матуразу, однако ORF матуразы не была расположена внутри кодирующей последовательности интрона. Два подвижных генетических элемента – протофаг и интрон группы I – состояли в симбиотических взаимоотношениях: ген, кодирующий матуразу, был необходим для успеха жизненной стратегии протофага, поэтому необходимости в размещении ORF матуразы внутри интрона не возникало. Затем, в ходе последующей эволюции, предки бактерий отказались от стемпинга, полностью перейдя на *bona fide* полимеразы. Вслед за хозяевами, на полимеразы перешли и протофаги. Сначала они пользовались хозяйскими полимеразами, а затем обзавелись собственным набором генов, обеспечивающих синтез ДНК, превратившись в *bona fide* фагов.

С переходом на полимеразы узы эндосимбиоза между фагами и интронами группы I были разорваны. Вследствие этого в одних фагах интроны были утрачены полностью, а в других интроны сохранились в качестве паразитов. Жизненный цикл паразитирующего на фагах интрона мог быть организован различными способами, и мы не станем углубляться в их обсуждение. Однако при любом способе самовоспроизведения паразитирующий на фагах интрон должен кодировать собственную матуразу. Таким образом, мы полагаем, что разбивающие гены белков интроны группы I бактерий в действительности являются паразитами фагов. Поэтому они, как правило, содержат ORF, кодирующую матуразу.

Интроны группы II. Интроны данной группы в бактериях ассоциируются с мобильными формами ДНК, главным образом плазидами, [717,782]. Можно предположить, что ранее эти интроны паразитировали на предках современных плазмид, что жизненный цикл тех и других основывался на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, как и у их хозяев (предков бактерий). Жизненные циклы плазмид и интронов изменились после того, как стемпинг у предков бактерий было отменено, а основой жизненного цикла стала репликация ДНК (обсуждается далее, в разделе 5.11). Однако жизненный цикл тех интронов группы II, которые кодируют собственную обратную транскриптазу, по-прежнему заключается в чередовании транскрипции и обратной транскрипции (обсуждается в далее, в разделе 5.11.2).

5.7. О феномене веригоншения и компрессии генов.

Громоздкость кристаллов, используемых в качестве основы, должна была стать фактором, не только обременяющим повседневную жизнь древнейших организмов, но и создающим препятствия к их эволюционному совершенствованию. В настоящем разделе показано, что использование стемпинга для обработки наследственной информации приводит к явлению, затрудняющему эволюцию, которое мы будем называть *компрессией генов*. Сделаны также попытки обнаружения последствий этого явления в современных геномах.

Выше мы условились называть друзовиками организмы, синтезирующих полинуклеотиды посредством стемпинга абиогенных кристаллов апатита. Первые из живых существ, населявших нашу планету, очевидно, должны быть



отнесены к этой категории. Обитали они у выходов геотермальных источников, поставлявших им свежие кристаллы апатита. Общее число таких организмов должно было определяться количеством подходящих кристаллов. Ввиду малой распространённости апатита в отложениях, характерных для выходов геотерм, при обилии источников пищи и энергии, наличие этого минерала рано или поздно должно было стать основным фактором, лимитирующим размеры популяции.

В процессе дальнейшей эволюции, по мере совершенствования клеточных мембран, ионных насосов и иных молекулярных приспособлений, должны были возникнуть организмы, способные концентрировать фосфат кальция и выращивать кристаллы апатита внутриклеточно. Изначально, содержащие кристаллы организмы могли возникнуть ради других каких-нибудь нужд или вследствие патологии. Затем были освоены и пути использования внутриклеточных кристаллов для обработки наследственной информации. Организмы, синтезирующие кристаллы апатита и использующие их для репликации и транскрипции, будут здесь и далее называться *веригоносцами*. С появлением веригонозения наличие (абиогенных) апатитовых кристаллов больше не было фактором, регулирующим общую численность живых существ на планете, и количество их возросло многократно. Некоторые из веригоносцев могли вести осёдлый образ жизни, другие могли обзавестись приспособлениями, обеспечивающими своим владельцам более или менее подвижное существование.

Веригонозение описанных выше древнейших организмов не следует путать с одноимённым феноменом в некоторых группах средневековых сапиенсов. Истончавшие плоть средневековые веригоносцы, восклицавшие «*Аз язвы Господа моего на теле моем ношу*» (Гал. 6:17), стремились к высвобождению духа от уз плоти, тогда как раннеархейское веригонозение стимулировалось побуждениями материального плана.

Клеточные жидкости современных организмов пересыщены относительно произведения растворимости апатита. Вопрос о том, какие молекулярные механизмы используются для предотвращения кальцинирования клеток (т.е. для недопущения образования кристаллического апатита в клетках), исследуется не один десяток лет. Мы не станем его здесь обсуждать. Для нас важен лишь тот экспериментальный факт, что поднятие концентрации фосфата до уровня насыщения внутриклеточной среды по отношению к апатиту при фоновых его содержаниях в среде обитания не составляет проблемы, по крайней мере, для современных организмов. Впрочем, освоив синтез апатитовых кристаллов, веригоносцы вскоре должны были столкнуться с новыми трудностями.

Необходимость соразмерять геометрические параметры кристалла с объёмом кодируемой информации вносила жесткие ограничения на размеры кристаллов. В отличие от современных микроорганизмов, нуждающихся в фосфоре главным образом для образования ДНК и РНК, веригоносцы должны были заготавливать значительно бóльшие его количества, достаточные для формирования кристаллов длиной в сотни микрон или даже в несколько миллиметров. Это рано или поздно должно было привести к дефициту фосфата в среде обитания. В таких условиях организмы, способные обойтись кристаллом меньших размеров при репликации и транскрипции, должны были получить преимущество и улучшить шансы выживания. Тем самым веригоносцы оказались вовлечены в эволюционный процесс, нацеленный на уменьшение размеров кристаллов основы. Наибольшее значение способность уменьшить размеры застрачиваемых кристаллов приобрела для тех веригоносцев, которые вели подвижный образ жизни. Уменьшение размеров отягчающей внутриклеточной каменной ноши давала особые преимущества при локомоции.

Простейший, наиболее очевидный способ уменьшения кристаллов основы состоит в укорочении генома. Веригоносцы должны были по возможности избавиться от некодирующей ДНК, удалить как можно больше интронов, а оставшиеся укоротить.

Дальнейшее укорочение генома возможно было только за счёт уменьшения размеров генов, кодирующих белки.

Укорочение генов предполагает уменьшение числа аминокислотных остатков в кодируемых протеинах. Тем самым, если размер генома становится фактором отбора, то рано или поздно эволюция сводится к решению весьма специфической оптимизационной задачи: для каждого протеина получить иной протеин с аналогичными или близкими свойствами, но состоящий из меньшего числа аминокислот. Конечным результатом такой эволюции становятся протеины, состоящие из *минимального* количества аминокислот. В дальнейшем эволюционный процесс, направленный на укорочение генома, будет называться *компрессией генов*.

Компрессия генов вносит жёсткие ограничения на уровень совершенства молекулярных устройств, возникающих в процессе эволюции. В алгоритмической теории информации в качестве меры сложности того или иного устройства используют длину самой короткой программы, при помощи которой функционирование устройства можно описать (т.н. *колмогоровская сложность*). Усложнение молекулярных машин в процессе эволюции не может быть осуществлено без удлинения кодирующих их программ, т.е. генов.

Помимо общего ограничения на степень сложности кодируемого молекулярного устройства, вносимого феноменом компрессии генов, имеются также ограничения, возникающие из невозможности получить желаемое устройство, возможное в принципе, путём точечных мутаций, потому что более крупные размеры молекулы могут быть нужны для функциональности промежуточных форм (при переходе от одной молекулы к другой). Чем меньше размеры молекулы, тем резче точечные мутации меняют её свойства. Влияние мутации в одном сайте крупной молекулы может быть до некоторой степени компенсировано мутацией в другом сайте, так что белок не утрачивает функций, тем самым сохраняя жизнь своему обладателю. Компрессия генов сужает «свободу манёвра» процессов молекулярной эволюции. Кроме того, эволюция белков часто осуществляется соединением нескольких блоков в одну молекулу с последующей «доводкой» путём точечных мутаций. Подобное комбинирование блоков, требующее укрупнения гена, может оказаться невозможным в условиях компрессии генов.

Из сказанного следует, что веригиношение и компрессия генов должны были приводить к повышению степени консервативности белков и к общему замедлению эволюционного процесса. Тем самым, восходящие к веригиносам таксоны современных организмов, должны отличаться в целом более низкими темпами эволюции, а ассоциирующиеся с веригиношением белки должны отличаться особенностями структуры. В следующих двух подразделах сделана попытка проверить данные предсказания.

5.7.1. Оценки скорости эволюции.

Выше, в разделе 5.2 при обсуждении роли геотерм демонстрировалось филогенетическое древо всех трёх доменов жизни, построенное на основании данных о последовательности нуклеотидов в РНК из малой субъединицы рибосомы, Рис 5-2. Расположение ветвей на древе позволяет судить об относительном возрасте той или иной группы организмов. В то же время есть и ещё один параметр, который может быть считан с этой диаграммы. Длина каждой из ветвей отражает общую степень изменчивости в пределах соответствующей группы. Этот параметр, согласно [106], может служить мерой скорости эволюции группы.

Ранее показанное на Рис. 5-2 древо использовалось для иллюстрации того факта, что пять наиболее древних групп микроорганизмов – *Aquificales* и *Thermotogales* в домене бактерий и *Nanoarchaeota*, *Pyrodictiaceae* и *Methanopyraceae* в домене архей – все являются гипертермофилами, в согласии с нашим положением об их происхождении от друзовиков, использовавших кристаллы abiогенного апатита, поставившихся

геотермальными источниками. В настоящем разделе нас интересует второй параметр, считываемый с древа – скорость эволюции.

Если веригоносцы возникли в ходе эволюции друзовиков, обитавших вблизи выходов геотерм, то и первые веригоносцы должны были обитать там же. Ввиду специфических особенностей метаболизма гипертермофилов, обусловленных высокими температурами, особенностями дыхания и видами пищи, доступной только вблизи геотерм, первые веригоносцы в течение какого-то времени должны были оставаться гипертермофилами. Отсюда следует, что древнейшие гипертермофилы должны характеризоваться аномально низкими скоростями эволюции, т.е. соответствующие им ветви на древе жизни должны быть короче, нежели у других групп. Именно это и наблюдается. Автор обзора [106] отмечает, что перечисленные пять групп древнейших организмов отличаются аномально низкой скоростью эволюции.

5.7.2. Консервативные последовательности белков.

Белок, эволюционирующий в условиях компрессии генов, может быть уподоблен путнику, положившему в сумку свою лишь совершенно необходимое ему в дороге. Поклажа легка. Но достаточно выхватить любую из помещённых в сумку вещей, и продолжение путешествия утрачивает смысл. Сходным образом, белки веригоносцев должны быть небольшого размера и обнаруживать необычную консервативность.

Предположим теперь, что с появлением полимераз надобность в веригоносении отпала, и размер молекулы более не является фактором отбора. В точности предсказать пути эволюционного изменения белков, конечно, не представляется возможным, но интуитивно, можно предположить, что развитие пойдёт в направлении дифференциации. Спустя какое-то время тот или иной белок веригоносца будет присутствовать в различных белках, катализирующих сходные превращения, в качестве активного центра или сайта связывания. Последовательность аминокислот центра будет по-прежнему консервативной, хотя содержащие её белки могут в целом и не обнаруживать существенной гомологии между собой.

Древние белки действительно часто содержат консервативные последовательности, соответствующие активному центру, окружённые громоздкими, сложноустроенными и лишёнными консервативности структурами, регулирующими тонкости распознавания субстратов. Ниже приводится пример консервативной последовательности в белке V-H⁺-PP_iase. Древность этой пирофосфатазы не вызывает сомнений, и в нём действительно обнаруживается консервативная последовательность, возможно, возникшая на этапе веригоносения.

5.7.2.1. Vacuolar pyrophosphatases (V-H⁺-PP_iase).

В клетках высших растений обнаруживается ряд ферментов, в качестве источника энергии использующих пирофосфат (PP_i), а не АТФ, [129]. В частности некоторые ионные насосы, т.н. *proton pumping pyrophosphatases* (H⁺-PP_iase) используют энергию, выделяемую при гидролизе неорганического пирофосфата до фосфата, для поддержания градиента протонов через биологические мембраны. Из них наибольшую известность получил т.н. *vacuolar H⁺-PP_iase* (V-H⁺-PP_iase), впервые выделенный из фотосинтезирующей пурпурной несерной бактерии (*purple non-sulfur bacterium*) *Rhodospirillum rubrum*. В настоящее время доказано, что этот протеин имеет очень широкое распространение, причём это пока единственный ионный насос, обнаруженный во всех трех доменах жизни, [130].

Функции и особенности строения. В клетках V-H⁺-PP_iases как правило локализируются на внутриклеточных мембранах: на мембране вакуолей (*tonoplast*) в растениях, на мембране ацидокальциосом (см. ниже раздел 5.6.3) в протистах, на инвагинациях плазматической

мембраны бактерий и архей). V-H⁺-PP_iase закачивает протоны вовнутрь ограничиваемого мембраной компартмента и тем самым поддерживает в нём высокую кислотность.

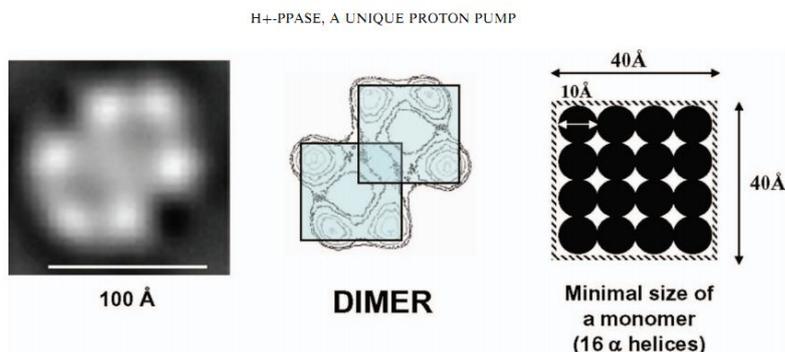


Рис 5-14. Электронно-микроскопическое исследование подтвердило, что вакуольный протонный насос V-H⁺-PP_iase имеет структуру гомодимера. (Dimeric structure of purified *T. maritima* H⁺-PP_iase as inferred from electron microscopy and single particle analysis. The average structure from particles present in protein preparations viewed by negative-staining electron microscopy (left) and the contour map showing six high density regions surrounding a bipartite less dense area strongly suggest a dimeric structure composed by two overlapped domains (center), the size of each being compatible with a 16-alpha helices protein in relaxed structure, as expected for the H⁺-PP_iase monomer (right). These results were the first direct visualization of a solubilized native H⁺-PP_iase dimer, and are in agreement with previous data obtained by indirect methods suggesting a dimeric structure.)
Из работы [130].

V-H⁺-PP_iase имеет наиболее простое строение из всех протонных насосов, известных по сие время, [130]. Среди всех ионных насосов, V-H⁺-PP_iase – это пока единственный гомодимер, Рис. 5-14. Кроме того, данный протеин отличается от других протонных насосов исключительно высокой гидрофобностью (осложнившей их концентрирование и изучение на раннем этапе исследований).

Первый ионный насос V-H⁺-PP_iase был открыт в 1966 году в хроматофорах пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodospirillum rubrum*. Несмотря на последующее обнаружение большого числа гомологов во всех трёх доменах жизни, насос, найденный первым, оказался уникальным. При исследовании этого белка было обнаружено, что под действием света он катализирует синтез пироглутамата (PP_i) из фосфата. Тем самым, V-H⁺-PP_iase из *R. rubrum* – это пока единственная известная альтернатива окислительному фосфорилированию.

Имеются веские основания предполагать, что PP_i (наряду с другими полифосфатами), использовался, по крайней мере, некоторыми древнейшими организмами, в первую очередь фотосинтезирующими, в качестве транспортировщика энергии до появления АТФ, см. например, обзоры [131,132]. Способность V-H⁺-PP_iase из *R. Rubrum* синтезировать PP_i наводит на мысль о происхождении гомологов этого протеина от общего предка, служившего источником энергии для некоего очень древнего фотосинтезирующего организма.

Древность V-H⁺-PP_iase. V-PP_iases обнаруживаются во всех анаэробных фотосинтезирующих прокариотах (но отсутствует у производящих кислород цианобактерий), у большинства одноклеточных эукариотов, включая воротничковых жгутиконосцев, по всему царству растений от одноклеточных водорослей до высших растений, по всей видимости, отсутствует у грибов, [130]. Сравнительно недавно был разрешён вопрос о наличии V-H⁺-PP_iase у некоторых насекомых. В частности, доказано присутствие V-H⁺-PP_iase в мембране похожих на ацидокальциосомы органелл из желтка яиц клопа *Periplaneta americana*, [133].

Широкое распространение V-H⁺-PP_iase несомненно свидетельствует о его древности. Авторы [273], на основании филогенетического анализа последовательностей

аминокислот в 279 гомологах пришли к выводу, что данный протеин уже имелся у общего предка архей, бактерий и эукариотов.

На основании перечисленных особенностей – широкая распространённость, простота строения, необычность химизма и структуры, а также тот факт, что V-H⁺-PP_iases используют PP_i, а не АТФ в качестве источника энергии, был сделан вывод о том, что V-H⁺-PP_iase вероятно представляет собой уникальное молекулярное ископаемое.

Связь с веригиношением. Авторы [134], исследовав последовательности нуклеотидов в генах кодирующих V-H⁺-PP_iase в 320 различных организмах, обнаружили высококонсервативный участок, состоящий из 57 аминокислотных остатков (strongly conserved 57-residue region). Этот участок содержит три подпоследовательности, хорошо сохранившиеся в ходе эволюции: GGG, DVGADLVGK, и DNVGDNVGD. Вопрос о природе консервативных участков в белках достаточно сложен. Высокая сохранность определённых участков белка в процессе эволюции может быть следствием компрессии гена, в древности кодирующего общий предок современных гомологов белка, но может она отражать и особенности химизма катализируемой реакции, по каким-то причинам препятствующей изменчивости белка. Нам остаётся лишь довериться опыту и интуиции авторов работы [135], назвавших консервативность указанных участков аномально высокой. В более позднем обзоре [132] тех же авторов столь высокая сохранность обсуждаемых участков в процессе эволюции объясняется как результат некоей «ранней оптимизации».

Если высокая консервативность описываемых участков V-H⁺-PP_iase является проявлением компрессии соответствующего гена, то можно с уверенностью утверждать, что компрессия эта имела место в геноме веригиносца. В самом деле, белок V-H⁺-PP_iase не мог возникнуть в клетке друзовика. Очевидно, родоначальный организм, оставивший после себя ген, кодирующий V-H⁺-PP_iase, должен был быть фотосинтетиком (в полном соответствии с упоминавшимися выше предположениями об использовании PP_i для транспорта энергии древнейшими фотосинтетиками). Друзовики же фотосинтезом заниматься не могли в силу характерных свойств их среды обитания.

Друзовики должны были быть существами осёдлыми, адаптировавшимися к жизни вблизи активных геотерм, поставлявших им кристаллы апатита подходящего качества. А активное гидротермальное минералообразование, как хорошо известно, не способствует прозрачности воды. Одновременное наличие свежих кристаллов апатита и солнечного света составляют условие невыполнимое. Друзовики не могли иметь способности к фотосинтезу, потому что у них не было возможности ею воспользоваться. Тем самым, белок V-H⁺-PP_iase мог возникнуть только в теле существа ведущего подвижный образ жизни, а на ранних этапах эволюции подвижность была невозможна без веригиношения. Тем самым, консервативные последовательности в V-H⁺-PP_iase, по всей видимости, представляют собой реликты древнего белка, эволюционировавшего в условиях компрессии генов.

5.8. Свидетельства палеобиологические.

Идентификация в геологической летописи окаменелых остатков организмов, копирующих свои полинуклеотиды посредством стемпинга, послужила бы серьёзным аргументом в пользу предлагаемой нами модели возникновения жизни. С практической точки зрения, особый интерес вызывает возможность обнаружения в этих остатках кристалла, используемого в качестве основы. Это, по существу, единственная возможность убедиться в том, что в качестве основы для стемпинга использовался именно апатит.

Обнаружение фоссилизированных остатков друзовиков представляется задачей практически неосуществимой ввиду древности и редкости организмов этой группы. Общее их число, напомним, определялось числом подходящих кристаллов апатита (если это был апатит), образовавшихся вблизи геотермальных источников. Гораздо более перспективным представляется поиск остатков веригоносцев, поскольку численность этих последних лимитировалась факторами, подобными тем, что лимитируют размеры и численность современных сообществ микроорганизмов.

Как показано в предшествующем разделе, низкая скорость эволюции, служащая признаком компрессии генов, отмечается среди гипертермофилов. Тем самым, веригоносцы, скорее всего, были гипертермофилами, не утратившими ещё связи с выходами геотерм, однако использующих эту среду как источник пищи и энергии, а не как источник кристаллов апатита. Количество таких источников в раннем архее, вероятно, превосходило многократно современное их количество, поскольку тогда ещё не закончились дегазация планеты и формирование океана. Поэтому следы обитавших в них веригоносцев могли сохраниться в соответствующих отложениях.

При жизни веригоносцы должны были выглядеть как кристаллы апатита, погружённые в органическое вещество. После фоссилизирования и метаморфизма остатки их должны представлять собой апатитовые кристаллы, окаймлённые графитизированной органикой. По аналогии с фоссилизированными остатками менее древних организмов, изотопный состав углерода в них должен отличаться от изотопного состава углерода в алмазе и графите абиогенного происхождения. Ниже представлены данные о морфологии и изотопном составе предполагаемых остатков организмов из отложений раннего архея. Окаменелости, обнаруживаемые в породах не древнее 3.5 млрд. лет представляют собой остатки эукариотов. В породах более древних обнаруживаются образования неясной природы, в виде мелких кристаллов апатита, окаймлённых графитом. Изотопный состав графита свидетельствует о его биогенном происхождении, а морфология образований в точности совпадает с предполагаемым обликом фоссилизированного веригоносца.

5.8.1. Микроскопические окаменелости из архейских пород не старше 3.5 млрд. лет.

Сравнительно недавно обращение к геологическим источникам для проверки каких-либо идей о происхождении жизни было бы занятием бесперспективным. В силу малой распространённости раннеархейских осадочных (точнее, метаосадочных) пород на поверхности земли и высокой степени их метаморфизма (фашии зелёных сланцев и выше), в распоряжении палеобиологов не было ни одной надёжно установленной окаменелости или доказанного проявления биологической активности старше 3 млрд. лет. Ситуация изменилась кардинальным образом в течение последних 10-15 лет, с внедрением в повседневную практику исследований ряда приборов, позволяющих отслеживать вариации химического состава окаменелостей и изотопного состава углерода в микронных масштабах и одновременно исследовать их структурные взаимоотношения методами рентгеновской микроскопии, рамановской спектроскопии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

Указанными методами в предполагаемых окаменелостях были надёжно идентифицированы клеточные структуры, в т.ч. деление клеток, Рис. 5-16, 5-17. Проведённые исследования изотопного состава углерода в этих микроскопических образцах подтвердили биогенное происхождение окаменелостей, Рис. 5-18. Для карбонатных окаменелостей среднее значение $\delta^{13}\text{C}_{PDB}$ оказалось равным $-5 \pm 10\%$, а для керогена оно лежит в диапазоне от -27 до -32% . Тем самым значения $\delta^{13}\text{C}_{PDB}$ оказались близки к соответствующим величинам, типичным для современных хемоавтотрофных микроорганизмов.

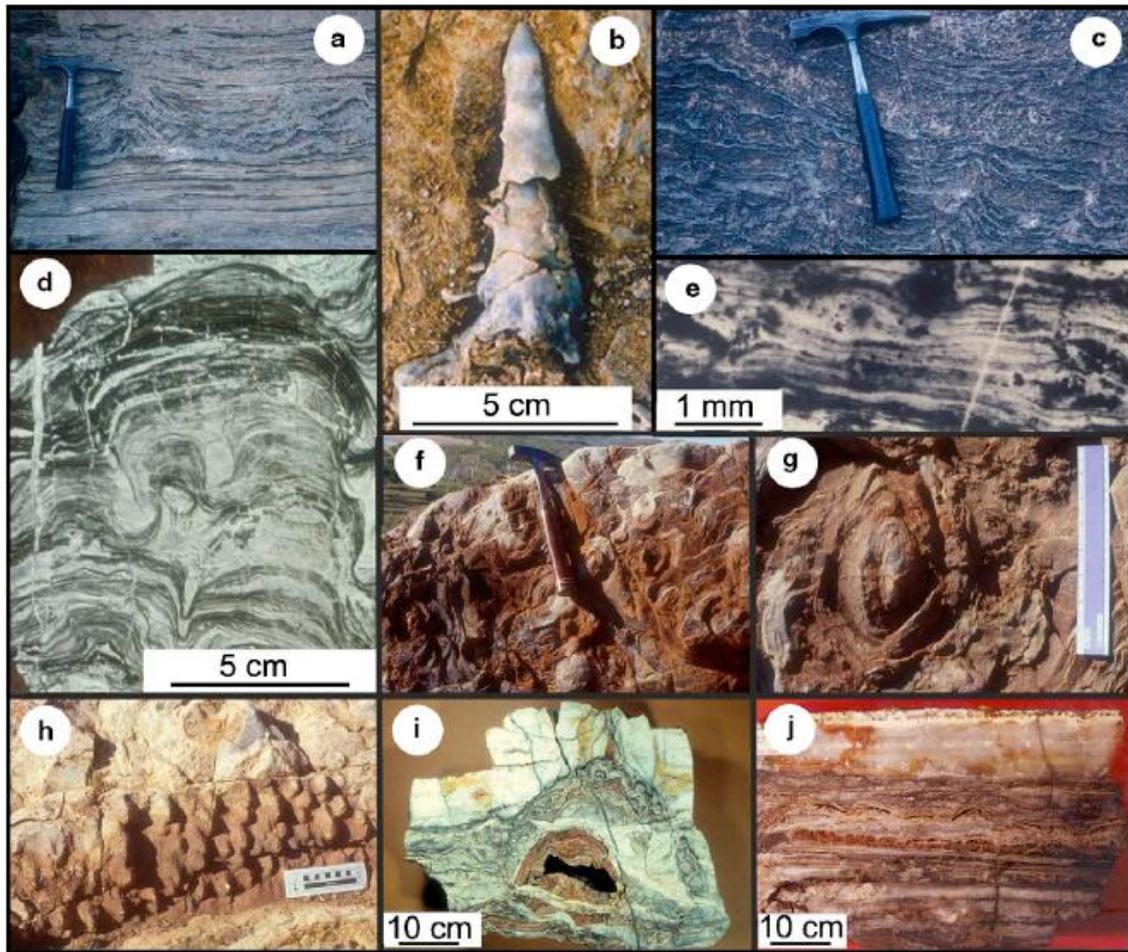


Рис 5-15. Раннеархейские строматолиты, не старше 3.5 млрд. лет, произведённые микроорганизмами похожими на современные: (a–c) Stratiform and conical stromatolites from the "2985 Ma Insuzi Group, South Africa (Beukes and Lowe, 1989); photo in (b) courtesy of N.J. Beukes. (d) Laterally linked, low relief stratiform to domical stromatolitic mats from the "3245 Ma Fig Tree Group of South Africa (Byerly et al., 1986); photo courtesy of D.R. Lowe. (e) Stratiform microbial mats from the "3320 Ma Kromberg Formation of South Africa (Walsh and Lowe, 1985). (f–h) Conical stromatolites from the "3388 Ma Strelley Pool Chert of Western Australia (Hofmann et al., 1999; see also Allwood et al. 2007 of Precambrian Research, p. 198); scale in (g) = 20 cm; scale in (h) = 10 cm. (i) Domical and (j) stratiform stromatolites from the 3496 Ma Dresser Formation, Western Australia (Walter et al., 1980; Buick et al., 1981).
 Из работы [137].

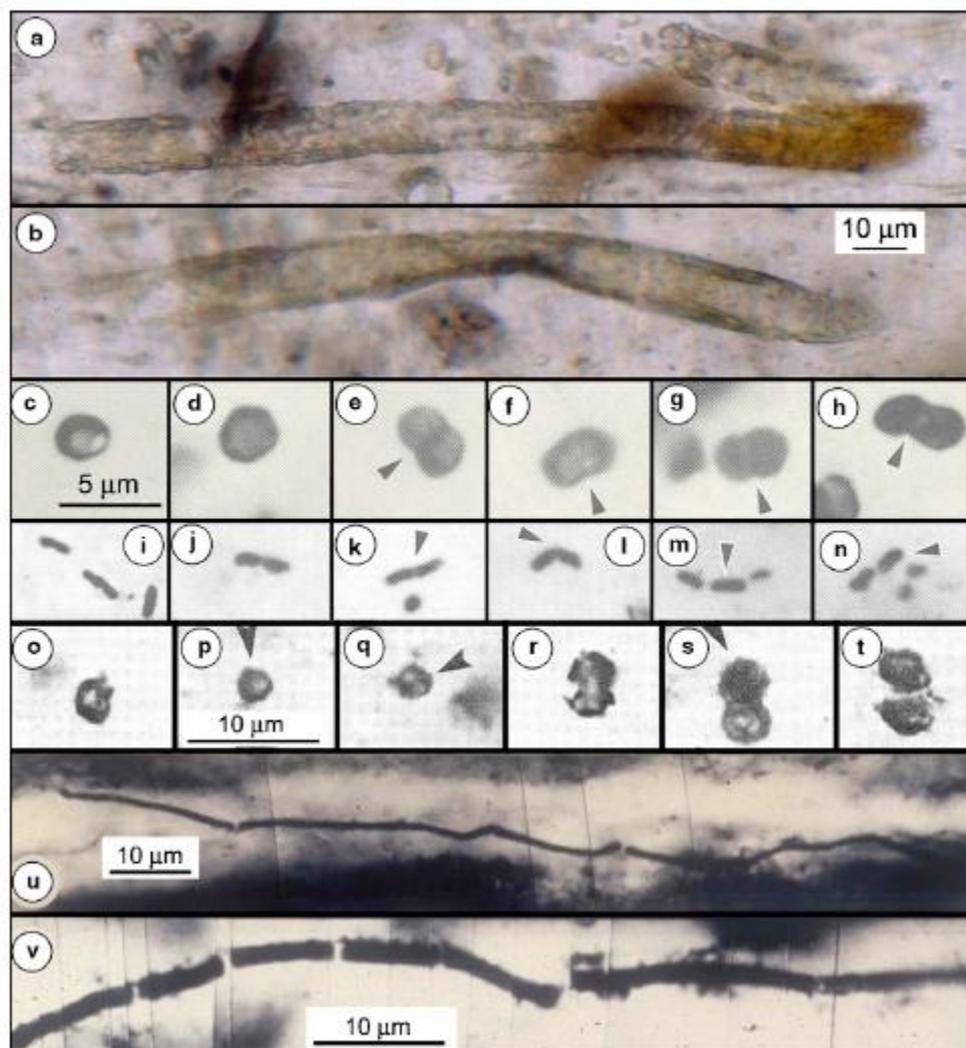


Рис 5-16. Микроскопические окаменелости из архейских строматолитов (Representative Archean microfossils in petrographic thin sections): (a and b) Broad prokaryotic (oscillatoriacean cyanobacterium-like) tubular sheaths (*Siphonophycus transvaalense*) from the "2516 Ma Gamohaан Formation of South Africa (Klein et al., 1987; Buick, 2001); scale shown in (b). (c–h) Solitary or paired (denoted by arrows) microbial coccoidal unicells, and (i–n) solitary or paired (denoted by arrows) bacterium-like rod-shaped unicells from the "2600 Ma Monte Cristo Formation of South Africa (Lanier, 1986; Buick, 2001); scale for parts (c–n) shown in (c) (modified after Lanier, 1986). (o–t) Solitary and paired microbial coccoidal unicells from the "3260 Ma Swartkoppie Formation of South Africa, in (p–s) ordered in a sequence inferred to represent stages of cell division (Knoll and Barghoorn, 1977); arrows point to dark organic contents within cells; scale shown in (p); (modified after Knoll and Barghoorn, 1977). (u) Narrow bacterium-like filament and (v) broader microbial filament from the "3320 Ma Kromberg Formation of South Africa (Walsh and Lowe, 1985; Walsh, 1992; Schopf et al., 2002).

Из работы [137].

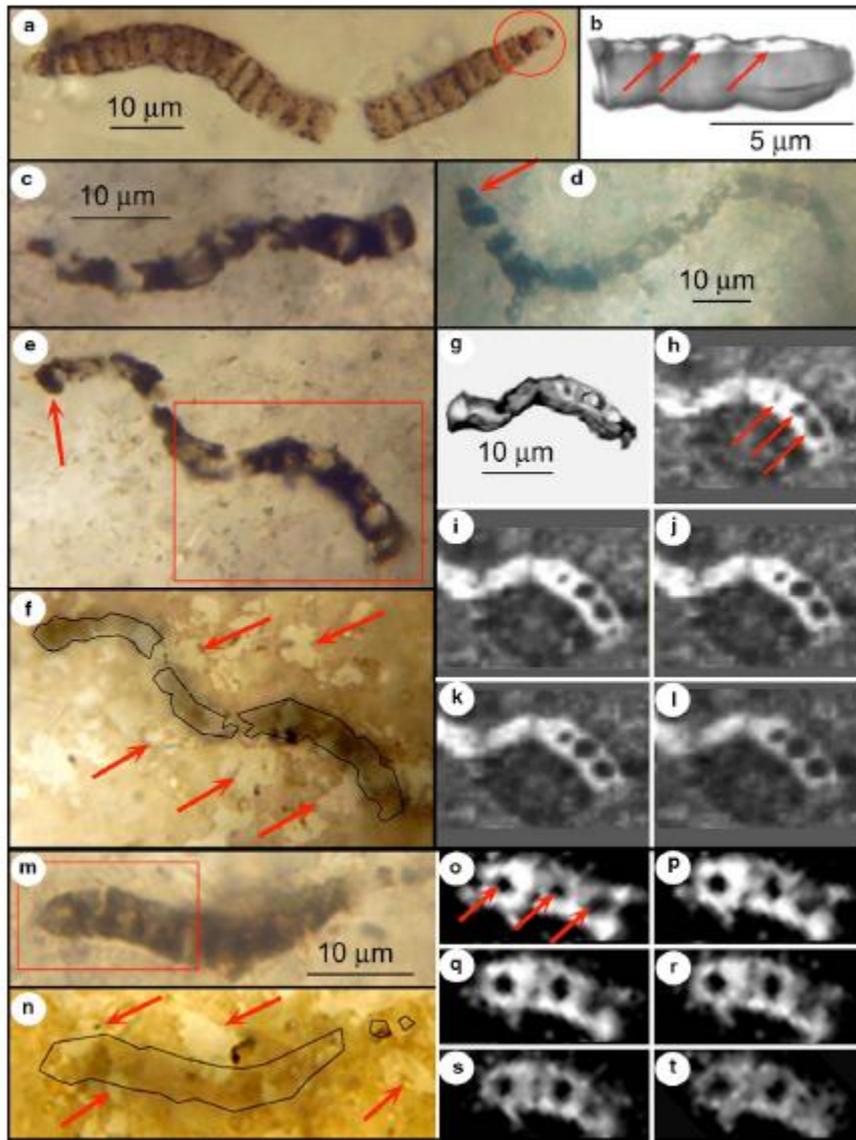


Рис 5-17. Сравнение остатков раннеархейского организма возрастом ~3465 млн лет с менее древней окаменелостью возрастом ~750 млн лет. Permineralized carbonaceous filaments in petrographic thin sections of cherts from the "750 Ma Bitter Springs Formation (a and b, *Cephalophytarion laticellulosum*: Harvard University Paleobotanical Collections 58571; Schopf and Kudryavtsev, 2005) and the "3465 Ma Apex chert (c–l, *Primaevifilum amoenum*: c, Natural History Museum, London V.63164 [5]; d, V.63166 [1]; E–L, V.63164 [6]; and m–t, *P. conicoterminatum*: V.63164 [9]; Schopf, 1993). Magnification of (c, e, and f) denoted in (c), (g–l) in (g), and (m–t) in (m); (a, c–e and m) show photomontages. (a) Photomicrograph of *C. laticellulosum*; the circle denotes the region in (b). (b) Three-dimensional Raman image; arrows point to quartz-filled cell lumina (white) defined by carbonaceous walls (gray). (c and d) Photomicrographs of specimens of *P. amoenum*; arrow in (d) points to a rounded terminus. (e and f) Photomicrographs of *P. amoenum*, in (e) 3–9 µm below the section surface with the rectangle outlining the part in (g–l), and in (f) showing that the specimen (black outline) is embedded in irregularly shaped quartz grains (arrows). (g) Three-dimensional Raman image; the carbonaceous filament (gray) is cylindrical and quartz-filled (white). (h–l) Two-dimensional Raman images at sequential depths below the filament surface (h, at 0.75 µm; i, 1.5 µm; j, 2.25 µm; k, 3.0 µm; l, 3.75 µm); arrows in (h) point to cell-like quartz-filled compartments (black) defined by carbonaceous walls (white), evident also in (i–l). (m and n) Photomicrographs of *P. conicoterminatum*; the rectangle in (m) denotes the part of the filament shown in (o–t); (n) shows the section surface and the position of the embedded filament (black outline) with arrows pointing to irregularly shaped quartz grains. (o–t) Two-dimensional Raman images at sequential depths below the filament surface (o, at 1.5 µm; p, 2.25 µm; q, 3.0 µm; r, 3.75 µm; s, 4.5 µm; t, 5.25 µm); arrows in (o) point to cell-like quartz-filled compartments (black) defined by carbonaceous walls (white), evident also in (p–t).

Из работы [137].

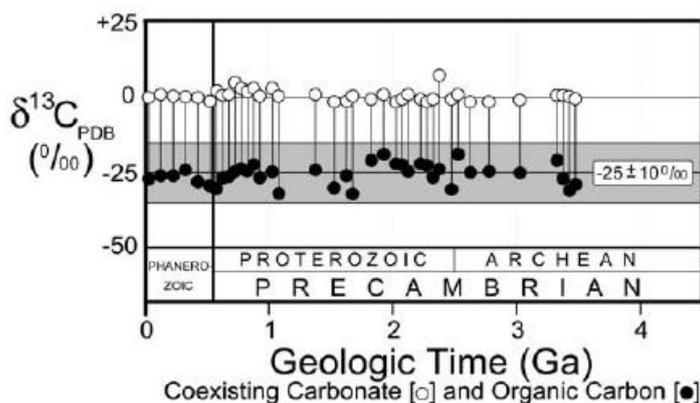


Рис 5-18. Изотопный состав углерода в сосуществующих карбонатах и органическом материале из архейских и протерозойских пород. Carbon isotope values for coexisting carbonate and organic carbon measured in bulk samples of Phanerozoic and Precambrian sedimentary rocks (Strauss and Moore 1992). The Precambrian is represented by data from 100 fossiliferous cherts and shales, and the data are shown as average values for groups of samples from 50 Myr long intervals. *Из обзора [138].*

В результате проведённых исследований о биогенной природе ряда раннеархейских строматолитов можно сейчас говорить с той же степенью уверенности, с какой говорят о биогенности строматолитов протерозойских. В частности, отпали всякие сомнения в биогенности строматолитов формации Ma Dresser в Западной Австралии возрастом ~3490 млн лет.

В настоящее время можно считать доказанным, что 3.5 млрд. лет назад Земля была заселена различными типами микроорганизмов, в том числе эукариотов, принципиально не отличающимися от современных.

5.8.2. Предполагаемые окаменелости древнее 3.5 млрд. лет.

Как было указано выше, микроскопические окаменелости из формации 3496 Ma Dresser в Западной Австралии возрастом ~3465 млн лет оказываются остатками достаточно сложно организованных существ, Рис. 5-16, 5-17. Очевидно, жизнь к этому времени должна была просуществовать на земле длительное время, понадобившееся для их эволюционного развития. Однако шансы обнаружения остатков организмов древнее 3.5 млрд. лет крайне малы, потому что на всей поверхности земли известно лишь несколько выходов осадочных архейских пород такого возраста, и степень их метаморфической переработки (амфиболитовых и более высоких фаций метаморфизма) не оставляет надежд на сохранение окаменелостей.

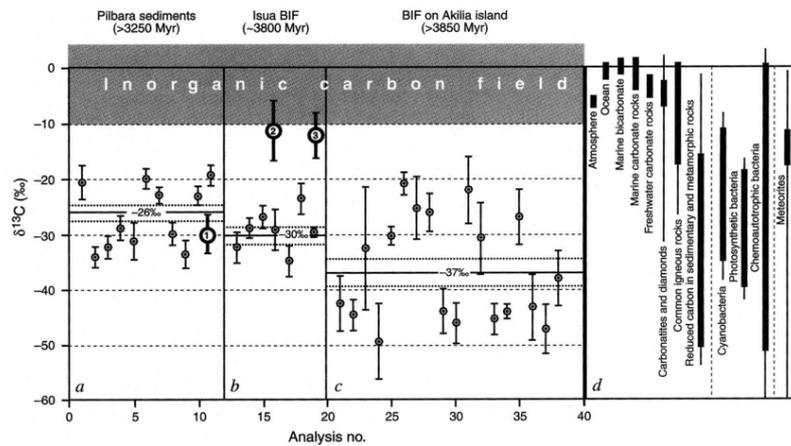
В 1996 году американский геолог Steve Mojzsis (венгерского происхождения, фамилия произносится как Мойджиш) предпринял попытку разыскать более древние следы жизни, ориентируясь на химические и изотопные, а не морфологические характеристики углеродистых осадков, используя ассоциацию апатита с графитом в качестве биомаркера. Биогенная органика, – полагал он, во все времена была богата фосфором, и накопление её по логике вещей должно приводить к образованию фосфоритов. В процессах метаморфизма фосфориты, как правило, преобразуются в смесь кристаллов апатита и карбонатных минералов, которая обычно содержит примеси углеродистых частиц или графита (в зависимости от фации метаморфизма).

Поиски Мойджиша увенчались успехом. Ему удалось обнаружить зёрна апатита с включениями графита в яшмах и железистых кварцитах (chert and banded iron formations) трёх формаций архейского возраста: яшм метаморфизованных в фации зелёных сланцев из формации *Nickol Bell* метаморфического пояса *Roebourne* кратона *Pilbara* в северо-западной части Западной Австралии возрастом ~3.2 млрд. лет, железистых кварцитов пояса *Isua* Западной Гренландии возрастом не моложе 3700 млн лет и, наконец, кварц-пироксеновых гнейсов комплекса *Itsaq* из архейских железистых кварцитов с острова

Akilia у Южного побережья Западной Гренландии возрастом ~3.83 млрд. лет. Последние остаются наиболее древней осадочной породой из всех обнаруженных по сие время.

Замеры изотопного состава углерода графитовых частиц, выполненные ионным зондом, показали существенное обогащение лёгкими изотопами углерода, Рис 5-19. В осадках более молодого возраста такой изотопный состав углерода уверенно интерпретируется как биомаркер, [139].

FIG. 2 Isotope compositions of carbonaceous inclusions in individual apatite grains from early Archaean sediments measured by ion microprobe. a, West Pilbara sediments, Roebourne Belt, Western Australia (>3,250 Myr), samples courtesy of K. Sugitani; the data indicated by '1' are previous whole-rock measurements¹⁵⁻¹⁷ of Warrawoona Group sediments for comparison; b, Isua supracrustal belt BIF (>3,700 Myr; field sample no. 3381, Isukasia, West Greenland; courtesy of E.I. Robbins and P.W.U. Appel); '2' and '3' indicate respectively previously whole-rock measurements reported by Schidlowski *et al.*¹⁸ and Hayes¹⁹. c, BIF from Akilia island (>3,850 Myr) in southern West Greenland⁹. d, Carbon isotope variations found in nature. Standard deviations for the ion microprobe data are indicated by the vertical lines (1 σ). Dotted lines above and below the weighted means of the data correspond to the 2 σ confidence interval. METHODS. Cleaned rock chips, taken several centimetres away from



weathering surfaces and free from cracks, were cored to yield 25-mm-diameter rock disks of 5 mm thickness. These were polished with alumina powder in distilled water and drilled with an ultrasonic microcorer to produce a 3-mm-diameter hole at their centres, then sonically cleaned in successive ethanol and ultrapure water baths before being dried in air. Plugs 3 mm in diameter of pelletized USGS 24 graphite standard ($\delta^{13}C_{PDB} = -16.0\%$) were inserted into the central hole and the section was then Au-coated. Carbonaceous inclusions in the apatite were sputtered by a focused Cs⁺ beam in the CAMECA ims1270 ion microprobe at UCLA, and charge compensation during negative ion extraction was maintained by using a normal-incidence electron gun. Carbon isotopic measurements were per-

formed by standard ion microprobe techniques^{19,32} utilizing magnetic peak switching at high mass-resolving power and ion counting with an electron multiplier. The carbon isotope ratios, corrected for deadtime and instrumental mass fractionation, are reported relative to the VPDB standard using

the conventional delta notation. The mass-fractionation correction procedure assumes that the degree of bias for the lighter isotope inherent in the sputtering process is the same for the carbonaceous inclusions in the apatite as for the graphite standard. Measurements on a suite of kerogen samples differing by a factor of ~7 in H/C ratio show that the effect of such structural and compositional variations between the standard and the sample is small (<2%) in agreement with earlier, less precise findings³³. The inorganic carbon field is the region of carbon isotopic compositions defined as characteristic of inorganic carbonate carbon and non-bioorganic reduced carbon.

Рис 5-19. Изотопный состав углерода графитовых включений в апатите из древнейших архейских осадков, замеренные ионным зондом.

- (a) West Pilbara, Пояс Roebourne, Западная Австралия (>3.25 млрд. лет)
- (b) Железистые кварциты Isua Belt, Западная Гренландия, (~3.8 млрд. лет)
- (c) Гнейсы с острова Akilia, южное побережье Западной Гренландии (>3.85 млрд. лет)
- (d) Вариации изотопного состава углерода на Земле.

Из работы [139].

Появление работы [139] вызвало ожесточённые дебаты между сторонниками и противниками биогенности углерода включений. Основная дискуссия сконцентрировалась вокруг древнейшего из трёх объектов – гнейсов с острова Akilia. Высказывались сомнения в древности самой породы, в том, что до метаморфизма порода изначально была осадочной, а не магматической, а также в аутентичности графитовых включений. В частности, значения $\delta^{13}C_{PDB}$, полученные для гнейсов Akilia, некоторым специалистам показались неправдоподобно низкими. Диапазон вариаций изотопного состава углерода в них сопоставим только с таковым для метановых бактерий, Рис. 5-19 (c-d). Однако метанотрофы для жизнедеятельности используют не только метан, но и кислород, коего в атмосфере Земли 3.85 млрд. лет назад быть не могло.

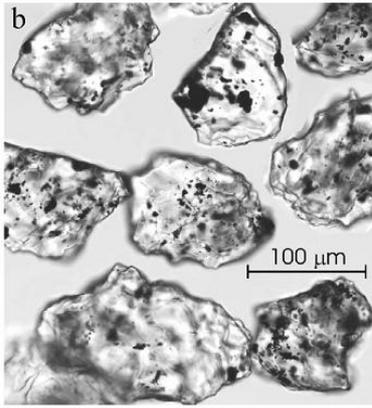


Рис 5-20. Зёрна апатита из метакарбонатной породы провинции Isua (возраст ~3.83 млрд. лет), с многочисленными включениями графита. *Из работы [140].*

Исследованные включения графита в зернах апатита под бинокулярным микроскопом и в проходящем свете в прозрачно-полированных шлифах выглядят как тонкие плёночки заключенные внутри кристалла или обволакивающие кристалл, Рис. 5-20. Высказывались соображения, что плёночки эти скорее напоминают структуры заполнения трещин, тем самым являются вторичными по отношению к гнейсам *Akilia*, менее древними, возможно возникшими из газовой фазы, например в реакциях с участием CO и CH_4 . Кроме того, в гнейсах *Akilia* были описаны гидротермальные изменения, сопровождающиеся графитизацией, и это послужило источником дополнительных сомнений в биогенности графита из апатитовых зёрен.

В ходе дискуссии гнейсы *Akilia* были повторно изучены различными методами и более тщательным образом. После дебатов, длившихся более десяти лет, сопровождавшихся публикацией десятков статей, было подтверждено, что до метаморфизма исходная порода была осадочной, [140]. Была подтверждена и её древность (не менее 3.83 млрд. лет, [142]). По крайней мере, две группы исследователей, вознамерившись перепроверить данные [139] об изотопном составе графита включений, не сумели разыскать апатита с графитовыми включениями на крохотном островке *Akilia*. После этого Mojzsis предложил собственные образцы независимой группе экспертов [143], подтвердившей аутентичность графита и обогащённость углерода лёгкими изотопами, свидетельствующую о биогенном происхождении.

Наконец, недавно беспрецедентное по тщательности и полноте минералогическое исследование апатит-графитовой ассоциации гнейсов *Akilia* было выполнено коллективом из восьми авторов, [144]. Простой перечень использованных приборов и методик занял бы четверть страницы. Полученные результаты имеют для нас принципиальное значение и потому будут обсуждены более детально.

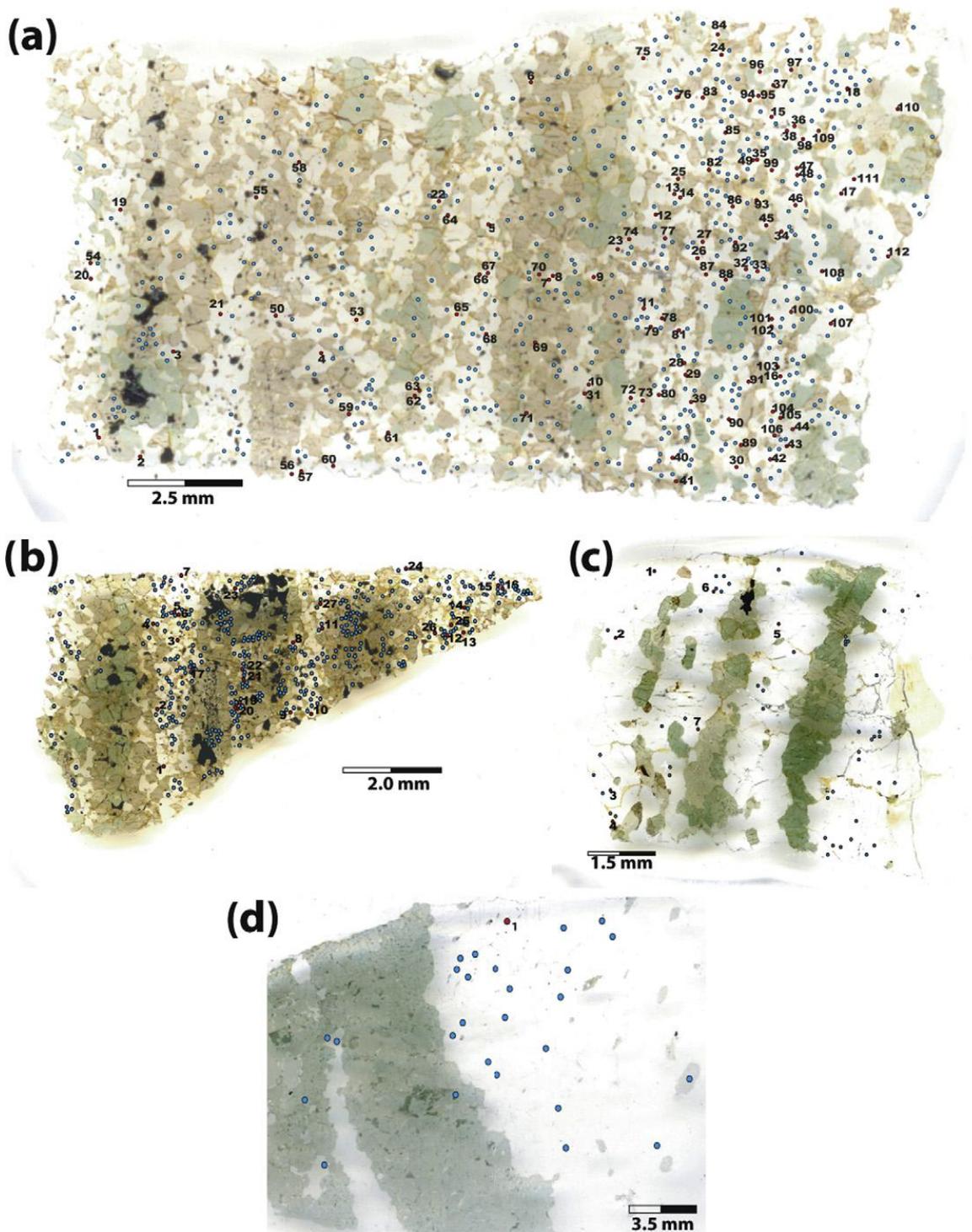


Рис 5-21. (a) A 90 μm thick thin section of the Akilia Qp rock showing the locations of euhedral apatite grains larger than 3 μm (blue dots) and occurrences with graphite (numbered red dots). Thin sections in a) and b) are fine-grained parts of sample G91-26, while c) is a coarse-grained part of sample G91-26, and d) is a coarse-grained portion of sample GR9707. *Из работы [144].*

Фотографии прозрачно-полированных шлифов исследованных в [144] образцов показаны на Рис. 5-20. Основу породы составляют кварц (белые кристаллы), клинопироксен (более крупные голубовато-зелёные зёрна), ортопироксен и амфибол (серые зёрна). Присутствуют также карбонатные минералы. Тёмные области на фотографиях – это скопления магнетита и некоторых сульфидных минералов. Зерна апатита показаны голубыми кружками. Зерна апатита с включениями графита занумерованы и отмечены красными точками.

Авторами обнаружены две генерации графита в исследованных образцах. Графит первой генерации выглядит под микроскопом как мелкие включения в апатите и инвагинации (структуры заполнения трещин). В действительности же – и это главный результат обсуждаемого нами скрупулёзного исследования – во всех изученных случаях графит первой генерации образует тонкие плёночки, обволакивающие кристаллы апатита. Авторы убедительнейшим образом доказали, что кажущееся присутствие графита первой генерации в виде включений и инвагинаций есть не более чем обман зрения. Все находения графита первой генерации представляют собой тонкие плёночки графита, обволакивающие апатитовые кристаллы.

На фотографиях хорошо видно, что не все зерна апатита заключены в графитовые оболочки. Согласно подсчётам авторов, в большинстве случаев графитовые оболочки наблюдаются у зёрен размером от 3 до 100 μm , Рис. 5-21 (a,b). В крупнозернистых образцах такие оболочки редки, Рис 5-21 (c,d). В подавляющем большинстве случаев графитовые оболочки обнаруживаются у кристаллов апатита, заключённых в кварц.

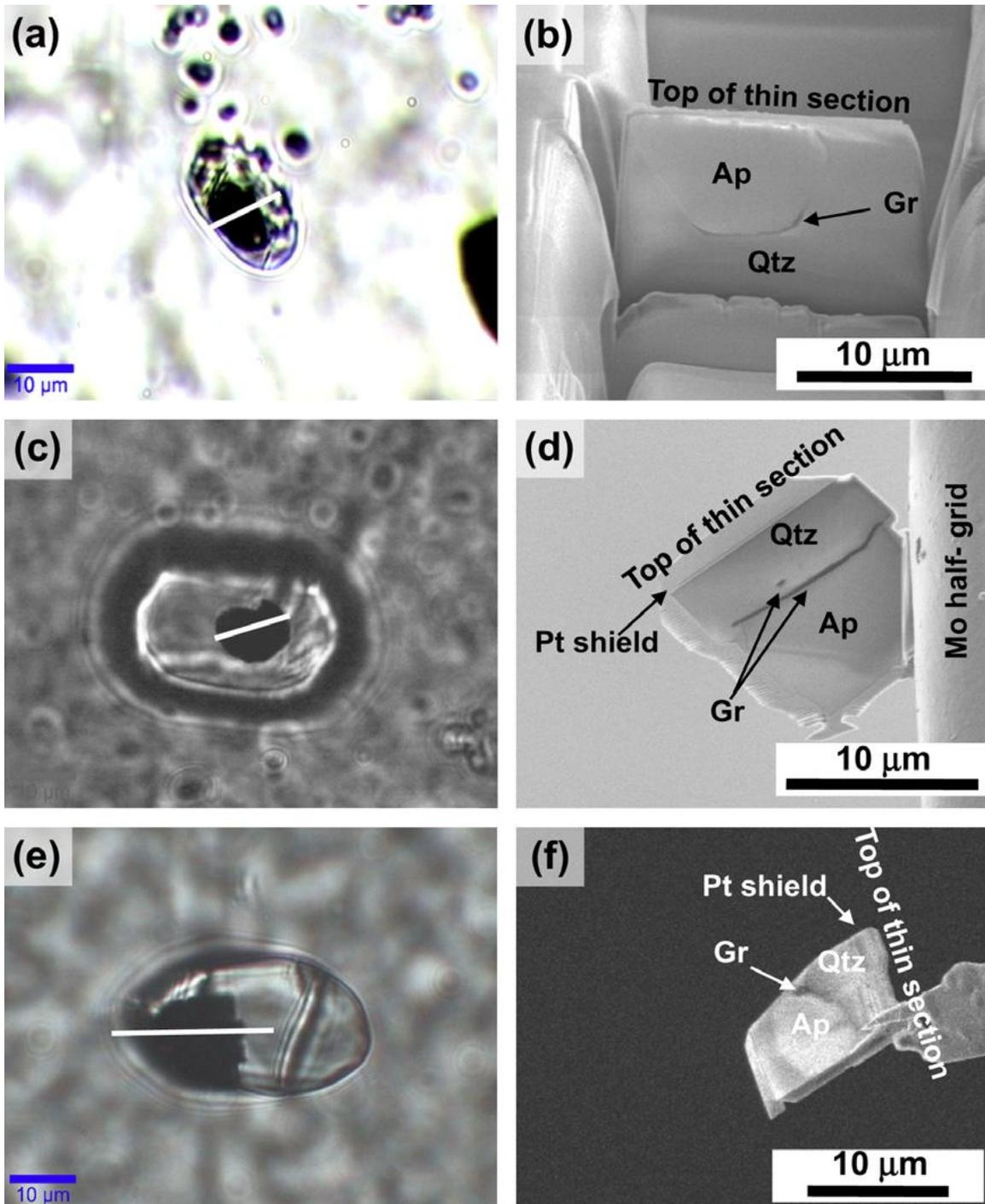


Рис 5-22. Графитовые пленки, обволакивающие апатит, заключённый в кварц . (a–f) Three targets of graphite associated with apatite extracted by the FIB-SEM method. Transmitted light images (a, c, and e) were used to target graphite + apatite associations from below the surface, since they could not be visualized directly by SEM. Different stages of the FIB process (b, d, and f) revealed that in all cases so far, graphite occurs as a ~500 nm coating at the interface of apatite and quartz.

Исследование поверхности шлифа не позволяет отличить зерно апатита, окружённое графитом со всех сторон, от графитового окаймления. Для разъяснения данного вопроса авторы извлекли из шлифов три мелких зерна апатита заключённых в кварц и приготовили их поперечные срезы. Изображения срезов показаны на Рис. 5-22 (b,d,f). Как можно видеть, все три зерна покрыты тонкими графитовыми оболочками со всех сторон. Графитовые пленки имеют постоянную толщину ~500 nm вне зависимости от размера и формы обволакиваемых кристаллов.

Микродифракцией электронов было выяснено, что во всех трёх случаях зерна апатита являются монокристаллами. Грани этих кристаллов хорошо различимы на Рис. 5-22 (b,d,f). Слой графита, непосредственно примыкающий к поверхности апатита, является монокристаллическим, причём имеет место эпитаксиальное нарастание графита на апатит. (К сожалению, авторы не представили всей информации, которая могла быть получена используемыми ими методами. Из приведенных в статье данных нельзя понять, какие именно грани апатита обрастают графитом.) По удалении от плоскости сопряжения графит становится поликристаллическим.

Графит второй генерации никак не связан с апатитом первой генерации. Он ассоциируется с кальцитом, магнетитом и сульфидами (пирротинном, пентландитом, халькопиритом), Рис. 5-23. Это типичная ассоциация скарнов, гидротермального происхождения. Тем самым графит второй генерации, заведомо abiогенный, скорее всего, является одним из продуктов гидротермальной переработки исходной метаморфической породы.

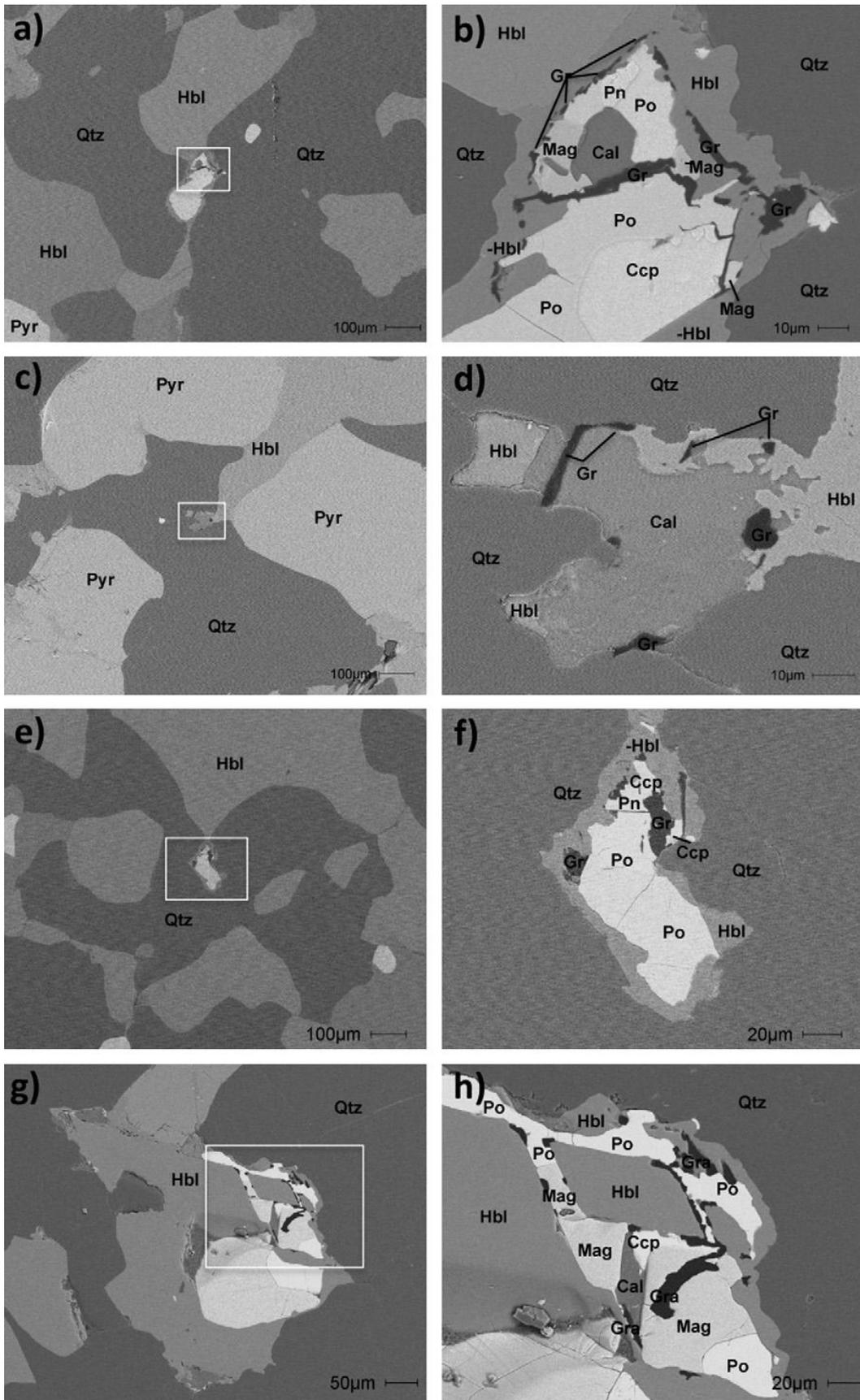


Рис 5-23. Графит второй генерации в гнейсах Akilia абиогенный, гидротермального происхождения, не имеет прямой связи с пленками графита на апатите. Back-scattered electron images of examples of regions where graphite is associated with calcite and other minerals. These mineral assemblages are typical for hydrothermal skarns in metamorphosed rocks and they are shown in their larger petrographic context. The following mineral abbreviations were used: quartz = Qtz; hornblende = Hbl; pyroxene = Pyr; magnetite = Mag; graphite = Gr; calcite = Cal; pyrrhotite = Po; pentlandite = Pn; chalcopyrite = Ccp.

Сами авторы [144], при обсуждении результатов, весьма осторожны в выводах. Они говорят о невозможности однозначной интерпретации полученных данных, как им кажется, не исключающих биогенного происхождения графитовых оболочек на апатите. Неуверенность авторов вполне объяснима. Описанные ими текстуры никогда ранее не встречались в горных породах, будь то биогенного происхождения или абиогенного. С одной стороны, непонятно, как тончайшие графитовые плёночки, ровным слоем окутывающие кристалл со всех сторон, могли бы образоваться в процессах осадконакопления, метаморфизма или гидротермальных изменений. С другой стороны, биогенное происхождение графитовых плёночек на зёрнах апатита выглядит ещё менее правдоподобным, если, следуя авторам, исходить из предположения об исходной фосфоритовой природе апатита.

Метаосадочные породы, состоящие из графита и апатита, обычно с примесью карбонатов, действительно образуются при метаморфизме фосфоритов. Однако текстуры их хорошо известны. Кристаллов апатита, обернутых плёночками органического материала или графита, никогда в них описаны не были.

Текстуры, возникающие в процессах осадкообразования, метаморфизма и метасоматоза, в целом хорошо изучены. Выделения графита второй генерации, например, с их характерными заливчатыми очертаниями указывают на метасоматическое происхождение. Графитовые оболочки первой генерации, Рис. 5-22 (b,d,f), не имеют даже отдалённых аналогов среди ранее описанного. В частности, включения и примазки графита, образующиеся при метаморфизме фосфоритов, выглядят иначе. Не похожи они и на окаменелости клеточных организмов, типичные представители которых показаны на Рис. 5-16, 5-17. Последние никогда не имеют столь правильных, упрощённых очертаний, как на Рис. 5-22 (b,d,f). И зёрен минералов тончайшим слоем они не чехлят.

Всё, разумеется, встаёт на свои места, если предположить, что мы имеем дело с остатками иных форм жизни, причём именно веригиносцев. Согласно изложенным выше представлениям, остатки веригиносцев должны представлять собой огранённые кристаллы апатита, обволакиваемые плёнкой органической слизи. В процессе фоссиллизации (окремнения) слизь превратилась в кероген, а позднее, на стадии метаморфизма, – в графит. Апатит не претерпевает изменений при метаморфизме, потому что этот минерал устойчив в очень широком диапазоне температур и давлений.

Становится также понятным, почему графитовые плёнки наблюдаются только на зёрнах апатита, заключённых в кварц. Здесь, вероятно, имеет смысл пояснить, что большая часть присутствующих в обсуждаемой метаосадочной породе минералов изначально в ней отсутствовала. Железосодержащие силикаты – пироксены и амфибол, например, образовались из филосиликатов и гидроокисей железа, пройдя через целый ряд замысловатых метаморфических реакций. Кварц изначально в осадке также отсутствовал. Он образуется на стадии катагенеза и на самых ранних стадиях метаморфизма в результате обезвоживания гидроокиси кремния (того, что по-английски называется chert; у нас эту породу обычно называют яшмой) при температуре не выше 180° С.

Очевидно, остатки веригиносцев, при седиментации попавшие в илистые осадки, богатые глинистыми минералами, утратили графитовые оболочки, поскольку перекристаллизация глин и последующие реакции с образованием железистых силикатов при более высоких температурах нарушали сплошность породы, делали её проницаемой для флюидов. Графит был утрачен на высокотемпературных стадиях метаморфизма (до 700° С для амфиболитовой фации) вследствие окисления (наличие в породе магнетита говорит об окислительных условиях, исключающих присутствие графита в равновесных условиях). В то же время, остатки веригиносцев, при седиментации попавших в гель гидроксида кремния (часто образующегося в подводных геотермальных системах), при более высоких температурах оказались запечатанными в кварц. Химическая инертность и низкая проницаемость кварца обеспечили изоляцию графитовых плёночек от воздействия

флюидов. Поэтому плёночки не только сохранились, что примечательно само по себе, но и сохранили свой изотопный состав.

Широкий разброс значений $\delta^{13}C_{PDB}$ в образцах графита, Рис. 5-19 (с), вероятно, объясняется присутствием двух генераций этого минерала в гнейсах *Akilia*. Только плёночки «замурованные» в кварц избежали последующего гидротермального изменения и потому углерод в них сохранил свой первоначальный изотопный состав. Необычно низкое среднее значение $\delta^{13}C_{PDB} = -37\%$ тоже не должно вызывать недоумения. Степень изотопного фракционирования в автотрофных организмах определяется механизмом фиксации CO_2 . Для архей, например, известно целых шесть путей фиксации углерода, два из которых были открыты совсем недавно. Каждый механизм фиксации углерода характеризуется определённым значением $\delta^{13}C_{PDB}$. В современных автотрофах значение $\delta^{13}C_{PDB}$ действительно не опускается ниже -30% , [108]. Необычное значение, полученное для графита из *Akilia*, видимо, говорит о каком-то ином, ещё неизвестном, механизме фиксации CO_2 , практикуемом веригиносцами.

Обратимся вновь к изображениям кристаллов апатита с оболочками из графита первой генерации представленным на Рис. 5-22 (b,d,f). На изображениях отчетливо различимы грани кристаллов. Возникает вопрос, была ли эта огранка приобретена в процессе метаморфизма, или уже на стадии осадконакопления зерна апатита представляли собой огранённые монокристаллы. (С точки зрения специалиста по химии твёрдого тела, метаморфизм есть не что иное, как сверхдлительный отжиг при очень высоком давлении, но не слишком высокой температуре, обязательно в присутствии паров воды. В процессе метаморфизма кристаллы, как правило, меняют свои очертания, минимизируя поверхностную энергию.)

Огранка апатитовых кристаллов на Рис. 5-22 (b,d,f) скорее всего, является первичной. В противном случае графитовые плёночки были бы разрушены или фрагментированы. Небольшой фрагмент плёночки внутри апатитового кристалла, ясно различимый на Рис. 5-22 (d), видимо, представляет собой результат повторного обрастания, т.е. отражает некоторую стадийность развития организма. Авторы отмечают, что фрагмент плёнки, погребённый внутри кристалла, имеет ту же толщину, что и все плёнки, обволакивающие кристаллы.

Все данные об изотопном составе и морфологии графитовых оболочек апатитовых кристаллов из гнейсов *Akilia*, очевидно, согласуются с предположением о биогенной природе этих образований. Более того, есть основания предполагать, что биогенным является и апатит, а не только графит, т.е. что мы имеем дело с фоссилиями веригиносцев, а не друзовиков. В самом деле, согласно наблюдениям авторов в [144], графитовые оболочки обнаруживаются у апатитовых зёрен размером от 3 до 100 μm . В крупнозернистых образцах оболочки редки. Столь малые размеры кристаллов (по сравнению с характерной длиной генома современного организма) могли быть следствием подвижного образа жизни своих владельцев. Таким образом, все данные о морфологии, изотопном составе окаймлённых графитом мелких апатитовых кристаллов из гнейсов *Akilia* согласуются с предположением о том, что эти образования представляют собой фоссилизированные остатки веригиносцев.

К большому сожалению, химический состав апатита гнейсов *Akilia* не был детально исследован ни в одной из известных мне публикаций. Особый интерес для нас представляла бы возможность оценить анионный состав – был ли это преимущественно хлорапатит, фторапатит или гидроксилapatит? Первичность апатита в гнейсах не вызывает сомнения. Зерна минерала, запечатанные в кварц, не могли изменить состав, коль скоро даже обволакивающий их графит сохранил исходные изотопные характеристики. Если наш вывод, что графит первой генерации в гнейсах *Akilia*

представляет собой фоссилизированные остатки веригоносцев, верен, то тогда следует признать, что в качестве основы эти организмы использовали именно апатит.

5.9. Цитологические свидетельства веригоншения.

Организмы, использующие стемпинг в качестве механизма передачи наследственной информации, должны в ходе эволюции пройти стадию веригоншения. Этот вывод был нами сделан ранее, в разделе 5.6. В том же разделе показано наличие косвенных признаков связанного с веригоншением явления компрессии генов в современных геномах. Окаменелости из древнейших метаосадочных пород, очень похожие на фоссилизированные остатки веригоносцев, обсуждались выше, в разделе 5.7. Тем самым, у нас есть основания считать современные организмы потомками веригоносцев.

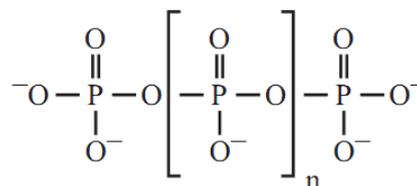
Использование внутриклеточного апатита в качестве средства передачи наследственной информации предполагает наличие специальных молекулярных приспособлений для выращивания кристаллов этого минерала и поддержания его в рабочем состоянии. Некоторые из таких механизмов могли, видоизменившись, сохраниться в современных клетках. В настоящем разделе сделана попытка собрать воедино разрозненные сведения о стяжениях фосфата в современных одноклеточных организмах. Ниже обсуждаются такие явления, как кальцинирование бактерий и митохондрий, в которых непосредственно наблюдается разрастание внутриклеточного кристаллического апатита. Далее изложены сведения о стяжениях внутриклеточного аморфного полифосфата, таких как волютин бактерий, гранулы в матриксе митохондрий, везикулы гидрогеносом и ацидокальциосомы. Совместное рассмотрение имеющихся данных приводит к выводу о сходстве этих явлений. Возможно, они являются рудиментами ранее существовавшей органеллы, содержавшей апатитовый кристалл, используемый в качестве основы.

Изложению предпослан краткий очерк биохимии неорганических полифосфатов, содержащий сведения, которые понадобятся нам в основной части раздела. В данном разделе не обсуждаются т.н. фосфатные вакуоли инфузорий. В целях ясности изложения, все сведения об инфузориях собраны в отдельный раздел (5.12.).

5.9.1. Неорганические полифосфаты как предшественники АТФ.

Основу аморфной субстанции, называемой *inorganic polyphosphate* (polyP), составляют отрицательно заряженные полианионы из нескольких фосфатных остатков, соединённых фосфоангидридными связями, аналогичных связям в АТФ, Рис. 5-24.

Рис 5-24. Неорганический полифосфат. Величина n в полианионах может варьировать в широких пределах.



В качестве катионов наиболее характерны кальций, магний и калий, иногда цинк. Число фосфатных остатков может варьировать от двух (пирофосфат, $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) до многих сотен. В лаборатории легко могут быть синтезированы различные нелинейные формы полифосфат-анионов, однако в живых клетках обнаруживаются только линейные полифосфаты. Разветвлённые и циклические формы в них отсутствуют, [146].

До 90-х годов прошлого века, из-за отсутствия адекватных методов анализа, о метаболизме и функциях polyP в клетках почти ничего не было известно, [147]. Не смотря

на то, что полифосфаты кальция составляет основу т.н. волутиновых гранул в бактериях и ацидокальциосом (*acidocalciosomes*) в клетках многих эукариотов (в том числе и в тромбоцитах млекопитающих), вещество это не привлекало внимания широкого круга исследователей.

Современный этап исследования polyP начался с разработкой принципиально новой методики анализа, основанный на применении двух ферментов: полифосфат-киназы (polyphosphate kinase, выделена из *Escherichia coli*), производящей АТФ из polyP и АДП, и экзополифосфатазы дрожжей (yeast exopolyphosphatase), способной гидролизовать polyP до фосфата, [148]. С использованием данной методики polyP был обнаружен во всех организмах, [149-152].

Установлено, что концентрация и функции polyP в клетках претерпевают существенные изменения в зависимости от специфики клетки и внутриклеточной локализации. Было выполнено грандиозное количество исследований биологических функций polyP в бактериях и одноклеточных эукариотах, имеется большое количество данных о функциях polyP в клетках насекомых, клещей и млекопитающих. Тем не менее, ни для одного из исследуемых организмов биохимия polyP не была изучена на уровне детальности, позволяющем понять метаболизм этого соединения.

Наличие полифосфатов является одним из факторов прямо или косвенно влияющих на рост клеток, адекватность их реакции на различные стрессы, вирулентность патогенов, [153]. Установлено, что в бактериях и одноклеточных эукариотах polyP принимает непосредственное участие в метаболизме и транспорте неорганических фосфатов, поддерживает запасы кальция [148], химически связывает и тем самым нейтрализует ионы тяжёлых металлов (продемонстрирована основанная на polyP устойчивость бактерий и архей к повышенным содержаниям свинца, алюминия, кадмия, меди, марганца, бария, кальция, урана, см. обзор [154]), является составным элементом мембранных каналов [155,156], входит в состав клеточной оболочки бактерий и принимает участие в её функционировании [157], регулирует активность генов и ферментов [158], является активатором Lon-протеазы (*Lon protease*) [159], обеспечивает селективность калиевых каналов (т.н. KcsA channel) [160]. Кроме того, polyP ингибирует деградацию РНК посредством образования polyP-РНК комплексов. О метаболизме и функциях polyP в клетках высших эукариотов известно меньше. Описанные функции включают в себя активирование TOR-киназы (TOR kinase) [161], регулирование процесса коагуляции крови, [162], инициирование апоптоза [163,164], участие в синтезе АТФ в рибосомах клещей [165] и млекопитающих [166]. В работах [167,168] показано, что polyP играет важную роль в активировании и регулировании т.н. *mitochondrial permeability transition pore*. Этими же авторами показано, что синтез полифосфата составляет часть процесса клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, [166]. О функциях polyP в клетках архей имеются лишь отрывочные сведения, [146].

Многообразие функции polyP в клетках и отсутствие связи между ними, вероятно, являются следствием того, что polyP присутствовал в древних формах жизни, возможно на самом раннем этапе эволюции, [169]. В обзорной статье [148] было высказано предположение, что полифосфаты использовались древнейшими организмами в качестве переносчика энергии, т.е. богатые высокоэнергетичными фосфодиэфирными связями молекулы polyP выполняли функцию АТФ. (Согласно авторам [150], первым эту идею высказал А.Н. Белозерский.) Веский аргумент в поддержку гипотезы об использовании polyP древними организмами в качестве переносчика энергии предложен авторами работы [170], исследовавшими активность полифосфатглюкокиназы в бактериях.

Киназами называют ферменты, катализирующие фосфорилирование. Биохимиками изучены многие сотни киназ, и почти все они используют АТФ в качестве донора фосфата. Однако в некоторых грамположительных бактериях обнаружены киназы, использующие для этого polyP. Всего таких киназ известно четыре: polyP-glucokinase (полифосфатглюкокиназа), polyP/ATP-glucokinase, polyP/ATP-glucomannokinase и

polyP/ATP-NAD kinase. Первые три катализируют фосфорилирование глюкозы (первый шаг гликолиза), а четвёртая катализирует фосфорилирование NAD (последний шаг в биосинтезе NADP). Из них полифосфатглюкокиназа имеет более широкое распространение и потому лучше изучена.

Установлено, что в некоторых бактериях фосфорилирование глюкозы полифосфаткиназой происходит с участием АТФ, а не polyP. Были также обнаружены бактерии с глюкокиназой, способной использовать обе молекулы, АТФ и polyP, в качестве донора фосфата. В бактерии *Micrococcus phosphovorans* была обнаружена полифосфаткиназа, использующая только polyP, [783]. В эукариотах этот фермент использует только АТФ. Согласно авторам [170], в организмах, наиболее древних в филогенетическом отношении, активность глюкокиназы в присутствии polyP в несколько раз выше, чем в присутствии АТФ. Для менее древних таксонов всё обстоит в точности наоборот. Из этого ими был сделан вывод, что глюкокиназа использующая polyP возникла в глубокой древности, когда polyP был основным переносчиком энергии, а АТФ имела подчинённое значение. В менее древних организмах, по мере того, как АТФ стала играть всё большую роль в метаболизме, глюкокиназы приспособились использовать АТФ в качестве донора фосфата.

Дополнительные аргументы, подкрепляющие гипотезу об использовании polyP в качестве переносчика энергии древнейшими организмами, были получены после расшифровки кристаллической структуры polyP/АТФ-глюкоманнокиназы, [171]. Сопоставление структуры polyP/АТФ-глюкоманнокиназы бактерий с гексокиназами эукариотов (первичная структура, третичная структура, детали строения сайтов связывания субстратов – глюкозы и фосфата) привёл авторов [171] к заключению, что оба фермента произошли от общего предка, использовавшего именно polyP (а не АТФ) в качестве донора фосфата.

5.9.2. Кальцинирование бактерий.

Выращивание внутриклеточных кристаллов апатита веригиносцем предполагает способность извлекать из окружающей среды и концентрировать кальций и фосфат. Такая способность действительно обнаруживается у бактерий, у митохондрий, согласно теории симбиогенеза являющихся видоизменёнными бактериями, но пока не обнаружена у архей.

Апатит в бактериях. Способность к кальцинированию с образованием апатитовых кристаллов обнаруживается у некоторых бактерий, живущих в полости рта и принимающих участие в образовании кариеса [172, 173, 174], у *Escherichia coli* [175], у некоторых бактерий обитающих в морской воде и в почве [176, 177].

Впервые кальцинирование было обнаружено у обитающей в зубном налёте бактерии *Bacterionema matruchotii* в начале 1960-х гг. Впоследствии список кальцинирующихся бактерий был пополнен. Так, в работе [174] были исследованы четырнадцать микроорганизмов обнаруживаемых в полости рта человека и мармозетов. В четырёх из них при благоприятных условиях обнаруживается кальцинирование. Ещё два вида кальцинирующихся бактерий из полости рта были исследованы в работе [173]. Электронно-микроскопические изображения кальцинирующейся бактерии *Streptococcus mutans* из полости рта человека, показаны на Рис. 5-25.

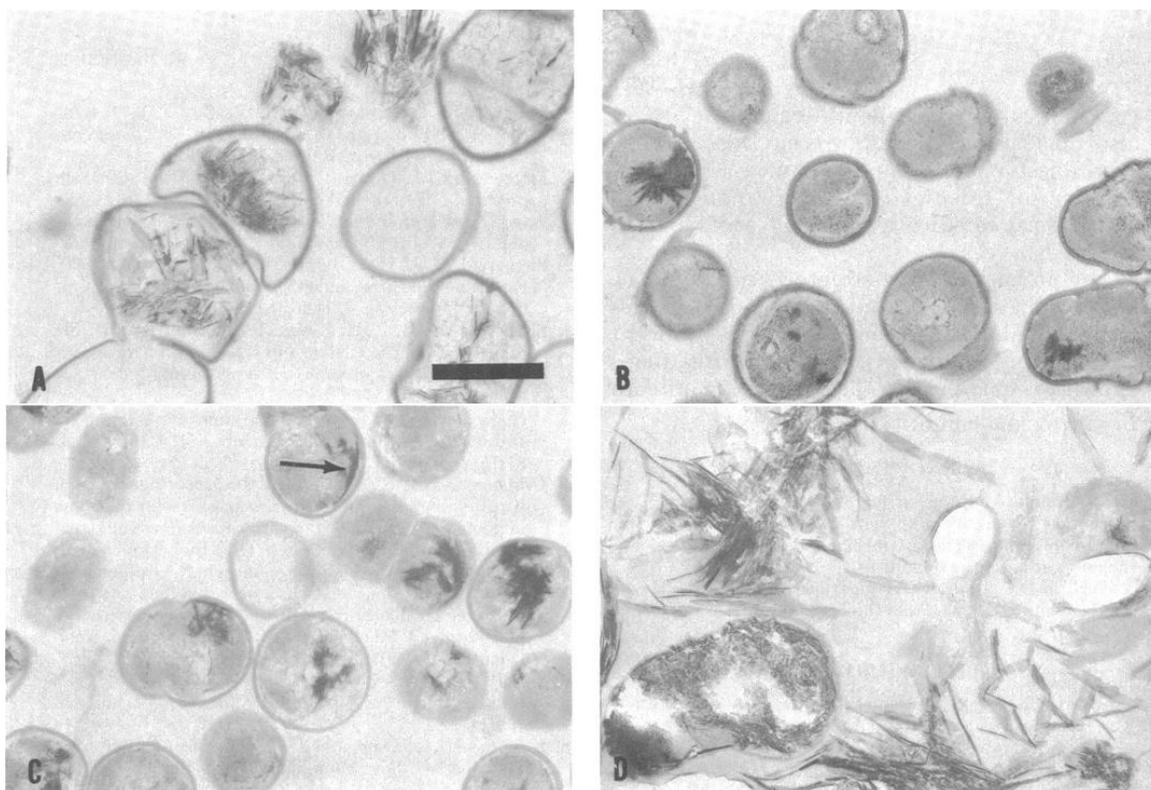


Рис 5-25. Электронно-микроскопические изображения различных линий (strains) бактерии *Streptococcus mutans* с кристаллами апатита. (А) линия OMZ-61, кристаллы образуются внутри клеток. Кристаллы, наблюдаемые вонне клеток, предположительно оказались снаружи вследствие протыкания мембраны при разрастании; (В) линия MFA-1, внутриклеточная минерализация; (С) линия MGS5, внутриклеточная минерализация. Видно, что на начальном этапе кристаллы разрастаются по внутренней поверхности мембраны; (D) линия S3, более поздний этап минерализации. Кристаллы апатита разрастаются во внутриклеточном пространстве. Более крупные кристаллы протыкают мембрану и разрастаются во внеклеточное пространство в виде радиально-лучистых агрегатов. Размер масштабной линейки – 500 nm.
Из работы [173].

Во всех кальцинирующихся бактериях описаны внутриклеточные отложения кристаллов апатита характерного игольчатого габитуса, часто в виде радиально-лучистых агрегатов. Скопления кристаллов обычно наблюдаются вблизи поверхности мембраны (Рис. 5-25 С). Отмечено, что радиально-лучистые агрегаты разрастаются из центра, расположенного на поверхности мембраны. Вследствие непосредственного контакта кристаллов с мембраной, разрастание кристаллов часто приводит к протыканию мембраны и появлению внеклеточного апатита.

Во всех цитируемых здесь публикациях наличие апатита (предположительно, гидроксилапатита) подтверждено рентгенографически. Значительное уширение дифракционных пиков свидетельствует о малом размере кристаллитов, мельче, чем в дентине. Надёжных данных о химическом составе и стехиометрии кристаллов нет вследствие их малости. Более детальный анализ кристаллов, выполненный в работе [177] для одной из бактерий показал значительную примесь карбоната, т.е. кристаллы представляют собой изоморфную смесь гидроксилапатита и карбонатапатита. Доказано, что апатит образуется в живых клетках.

В работе [178] на примере *Bacterionema matruchotii* было показано, что нуклеация кристаллов осуществляется неким фактором, содержащимся в мембране. Авторы сумели экстрагировать его из мембраны смесью хлороформа и метанола и продемонстрировали, что экстракт нуклеирует рост кристаллов апатита из раствора фосфата кальция *in vitro*. Впоследствии было установлено, что фактор нуклеации апатита из мембраны *B. matruchotii* является липопротеином. Первичная структура соответствующего апо-липипотеина была расшифрована в работе [179].

Несмотря на значительное число публикаций, посвящённых *Corynebacterium (Bacterionema) matruchotii* и другим бактериям, живущих в полостях зубов, у исследователей нет понимания причин, побуждающих бактерии сначала разрушать минерал зубной ткани, а затем его же переотлагать внутриклеточно. Судя по данным, упоминаемым в рефератах некоторых статей (в отсутствие оригиналов), процесс кальцинирования бактерий обнаруживает сходство с кальцинированием митохондрий (обсуждаемым ниже): появлению апатита предшествует образование гранул аморфного полифосфата кальция [180], или кальций-магниевого полифосфата [181]; отложение апатита ингибируется магнием [173, 182].

5.9.3. Кальцинирование митохондрий.

Положения теории симбиогенеза (*the endosymbiotic theory*), согласно которым митохондрии являются потомками единственной бактерии, некогда поглощенной клеткой археи или примитивного эукариота, ныне общепризнанны. Предок митохондрий был, по всей видимости α -протеобактерией (α -proteobacterium) близкой к риккетсиям, [203,204]. Известно, что симбиотические отношения двух клеток были установлены не менее полутора миллиардов лет назад. Остаётся неизвестным, на чём они были основаны, и какого рода организмом была клетка-хозяин: была ли она археей, или у неё уже имелись типичные органеллы эукариотов, такие как ядро или пероксисома.

Митохондрии (классические) обнаруживаются в клетках всех аэробных эукариотов. Их главной функцией является производство АТФ в процессе окислительного фосфорилирования за счёт энергии, выделяемой при окислении пирувата до CO_2 и H_2O . При этом молекулы АТФ синтезируются двумя путями: в результате субстратного фосфорилирования в жидкой фазе и в процессе мембранного фосфорилирования, использующем энергию трансмембранного электрохимического градиента протонов. Кроме того, в митохондриях синтезируются кластеры [Fe-S], входящие в состав многих белков. Митохондрии также играют ключевую роль в биосинтезе гемов (*haem biosynthesis*), гомеостазе кальция и в иницировании апоптоза. Говоря о жизненно-важных функциях митохондрий, нельзя не упомянуть о синтезе полифосфатов, осуществляемом в их мембране, [202].

Некоторые группы одноклеточных эукариотов – микроспоридии (*microsporidians*), метамонады (*metamonads*) и архамёбы (*archamoebae*) – лишены митохондрий. Ранее эти группы считались наиболее примитивными, ответвившимися от филогенетического древа эукариотов ещё до возникновения митохондрий, однако в настоящее время установлено, что их клетки содержат гидрогеносомы (*hydrogenosomes*) или митосомы (*mitosomes*) – клеточные органеллы, связанные с митохондриями общностью происхождения, [206-208].

В каком-то смысле гидрогеносома – это редуцированный анаэробный аналог митохондрии. Её главная функция, как и у митохондрии, заключается в производстве АТФ, с той разницей, что в гидрогеносомах пируват ферментируется с образованием ацетата, CO_2 , и молекулярного водорода (откуда и название), а АТФ производится лишь в процессе субстратного фосфорилирования. В гидрогеносомах также осуществляется биосинтез кластеров [Fe-S]. Представители наиболее редуцированной группы органелл родственных митохондриям – митосомы – не производят АТФ. Их единственная установленная функция – это синтез кластеров [Fe-S]. Вопрос о возможности синтеза неорганических полифосфатов в гидрогеносомах и митосомах – естественный ввиду наличия такой функции у митохондрий – нигде, насколько я могу судить, не обсуждался.

Происхождение митохондрий, гидрогеносом и митосом от единого общего предка было доказано посредством филогенетического исследования обнаруживаемых в них белков теплового шока Hsp 70, Hsp60 и Hsp10, [209], и сопоставлением генома гидрогеносом из некоторых анаэробных инфузорий с геномом митохондрий, [206]. Дополнительные доказательства филогенетического единства всех трёх органелл были

получены при исследовании механизмов переноса макромолекул (белков и тРНК) из цитозоля в митохондрии, гидрогеносомы и митосомы, [207].

Полифосфат-кальциевые гранулы митохондрий. В матриксе митохондрий часто обнаруживаются мелкие гранулы, обычно называемые *mitochondrial granules* или *electron-dense granules*. Чаще всего гранулы наблюдаются там, где внутренняя мембрана митохондрии непосредственно соприкасается с её внешней мембраной, [189]. Ни функции – ни даже элементный состав гранул не были надёжно определены, хотя с момента обнаружения в начале 50 гг. прошлого века гранулы эти многократно становились объектом исследований [190-194,189].

Гранулы в матриксе митохондрий были обнаружены начале 1950-х, с приходом электронной микроскопии в повседневную практику цитологических исследований. К середине 1970-х гг. сложились две противоположные точки зрения о возможной природе этих образований. Одни считали, что гранулы состоят из аморфного фосфата кальция. Их оппоненты пытались доказать, что гранулы представляют собой центры (*precursors*), из которых разрастаются новые складки внутренней мембраны митохондрий. Выводы первых базировались на данных анализов, выполненных с помощью электронного микронзонда и энерго-дисперсионного рентгеновского микроанализатора, показавших высокие содержания кальция и фосфора, [190,191, 195]. Представители второй группы исследователей обращали внимание на то, что результаты анализов зависят от метода приготовления образца, [192], а также на то, что в митохондриях некоторых клеток гранулы приобретали высокую электронную плотность лишь после фиксации препаратов тетраоксидом осмия. Высокие концентрации кальция в гранулах эти авторы считали артефактом, а сами гранулы полагали состоящими из фосфолипидов. Например, в работе [193] суспензии митохондрий разрушались ультразвуком, фиксировались специальными растворами и центрифугировались. Тяжёлая фракция, соответствующая – как считали авторы – гранулам, состояла в основном из фосфолипопротеинов. Среди органических консистентов гранул, обнаруженных сходными методами, упоминаются фосфолипиды (гл. обр. кардиолипин), гликопротеины, т.н. осаждаемые кальцием липопротеины (*calcium precipitable lipoprotein*), цитохром с-оксидаза, [189].

Отметим, что между двумя группами данных нет антагонизма. Аморфный polyP и фосфолипиды вместе являются основными компонентами ацидокальциосом, см. ниже. Кроме того, используя альтернативные методы, различные группы авторов могли в итоге исследовать состав различных объектов. Авторами [196], например, было обнаружено два типа гранул в митохондриях. Первые, более мелкие, имели низкую электронную плотность и не содержали кальция. Гранулы второго типа были крупнее, имели высокую электронную плотность и высокие концентрации кальция.

В современной литературе возобладала точка зрения, согласно которой гранулы митохондрий состоят главным образом из полифосфатов кальция, [176]. Имеющиеся результаты анализов гранул прекрасно согласуются с таким предположением. Присутствие polyP в митохондриях ряда организмов было продемонстрировано различными методами [166,183,201,202,154], хотя разрешающая способность существующих методик (методы «мокрой» химии, биохимические методы, анализ спектров ЯМР), конечно, недостаточна для обнаружения polyP в гранулах *per se*. Отсутствие кристаллических фаз в гранулах продемонстрировано дифракцией электронов, [195,199]. Существенный прогресс был достигнут в понимании физиологических функций гранул в некоторых типах клеток, и, как оказалось, функции эти могут быть разными. Например, функции гранул в митохондриях клеток сердечной мышцы млекопитающих, несомненно, отличаются от функций гранул в митохондриях хондроцитов, остеобластов и одонтобластов, [189,176,198-200]. Однако ни те, ни другие никак с образованием складок внутренней мембраны не связаны. В целом, гипотеза о полифосфат-кальциевой природе

гранул митохондрий представляется очень убедительной, хотя (на мой взгляд) она и не была доказана окончательно.

Кальцинирование митохондрий. В начале 60-х годов прошлого века была обнаружена способность митохондрий, извлечённых из печени крысы, быстро поглощать значительные количества фосфата кальция из водного раствора, с образованием плотных гранул аморфного полифосфата кальция, содержащим кальций и фосфат в мольном отношении 1.7 (для гидроксилапатита это отношение составляет 1.65). Явление это было впоследствии исследовано рядом авторов как *in vitro*, так и *in vivo* на примере митохондрий из самых разных представителей эукариот, например из дрожжей [183], проростков кукурузы [184], сердца кролика [185] и человека [186]. В 1960-1970 гг. было выполнено грандиозное количество сходных между собой исследований, посвященных деталям процесса кальцинирования митохондрий из различных тканей различных организмов, см. например ссылки в [176 и 187]. Кальцинированные митохондрии почки мыши показаны на Рис. 5-26, [188].

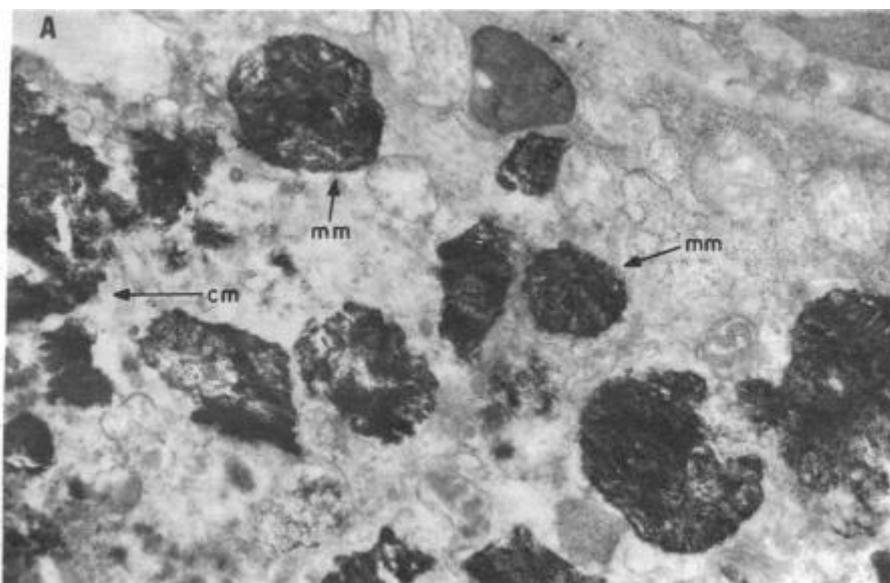


Рис 5-26. Электронно-микроскопическое изображение клетки почки мыши получившей инъекцию глюконата кальция в брюшную полость. Тёмные области – отложения аморфного фосфата кальция в митохондриях, (mm). Отдельные участки цитоплазмы тоже кальцинированы, (cm). Из работы [188].

На начальном этапе кальцинирования гранулы митохондрий служат центрами аккумуляции фосфатов кальция. В норме, гранулы округлой формы и имеют чётко очерченную границу, Рис. 5-27 (1). На начальном этапе кальцинирования гранулы обволакиваются слоем аморфного полифосфата кальция и вследствие этого укрупняются, очертания их становятся расплывчатыми, Рис. 5-27 (2). При дальнейшем кальцинировании или при более высокой исходной концентрации кальция образуются игольчатые кристаллы гидроксилапатита, Рис. 5-27 (3). Разрастаясь, кристаллы протыкают мембраны митохондрий, что приводит к их разрушению.

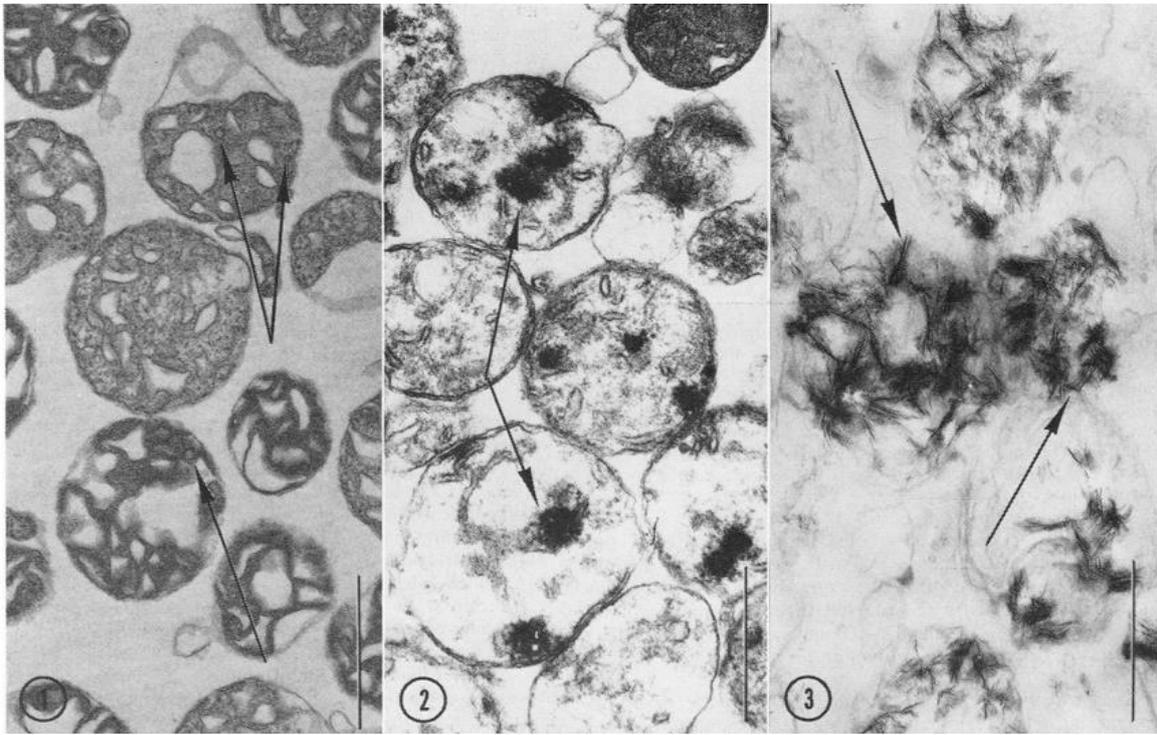


Рис 5-27. Кальцинирование *in vitro* митохондрий извлечённых из проростков кукурузы. (1): В митохондриях выдержанных в растворе фосфата в отсутствие кальция видны нормальные гранулы (стрелки), кальцинирования не наблюдается. (2): начальный этап кальцинирования митохондрий в растворе, содержащем кальций и фосфат-анион, гранулы обволакиваются слоем аморфного полифосфата. (3): разрастание игольчатых кристаллов апатита (стрелки) на более поздней стадии кальцинирования. (Line scale in Fig. 1 represents 1 μm . Figs. 2 and 3 are at same magnification as Fig. 1.

Fig. 1: mitochondria incubated for 3 min in 4 ml of reaction media containing 200 mM KCl, 20 mM tris-HCl (pH 7.4), 1 mg/ml bovine serum albumin, and 4 mM Pi. Arrows point to normal granules. Fig. 2: incubated for 3 min in reaction medium as in Fig. 1 before addition of 40 μmoles of malate + 40 μmoles of pyruvate and 20 μmoles of CaCl_2 . Three μmoles of NADH were also added. Mitochondria were fixed 15 min after initial substrate addition. Fig. 3: same as Fig. 2, but with three additions of 40 μmoles of malate + 40 μmoles of pyruvate, 3 μmoles of NADH, 64 μmoles of Pi, and 80 μmoles of CaCl_2 spaced 5 min apart. Mitochondria were fixed 25 min after the initial substrate addition. Large amounts of substrate and longer loading time are essential for the accumulation or massive crystalline deposits. Arrows show crystalline deposits.)
Из работы [184].

Кальцинирование митохондрий происходит с затратой энергии. В опытах *in vitro* в качестве источника энергии обычно используются пируват, соли яблочной и янтарной кислот, NADH. При замене иона Ca^{2+} на Mn^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+} аккумуляция фосфатов в митохондриях происходит сходным образом. В тоже время наличие ионов Mg^{2+} в растворе приводит к резкому замедлению процесса отложения аморфного полифосфата и блокирует образование кристаллов апатита, Рис 5-28, [185].

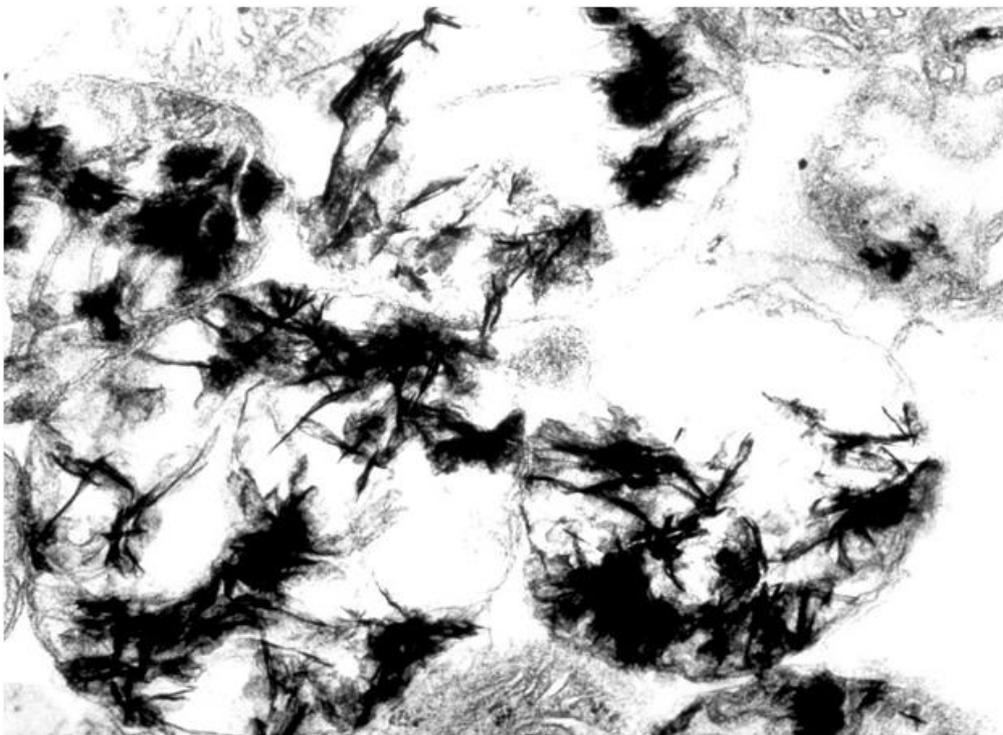
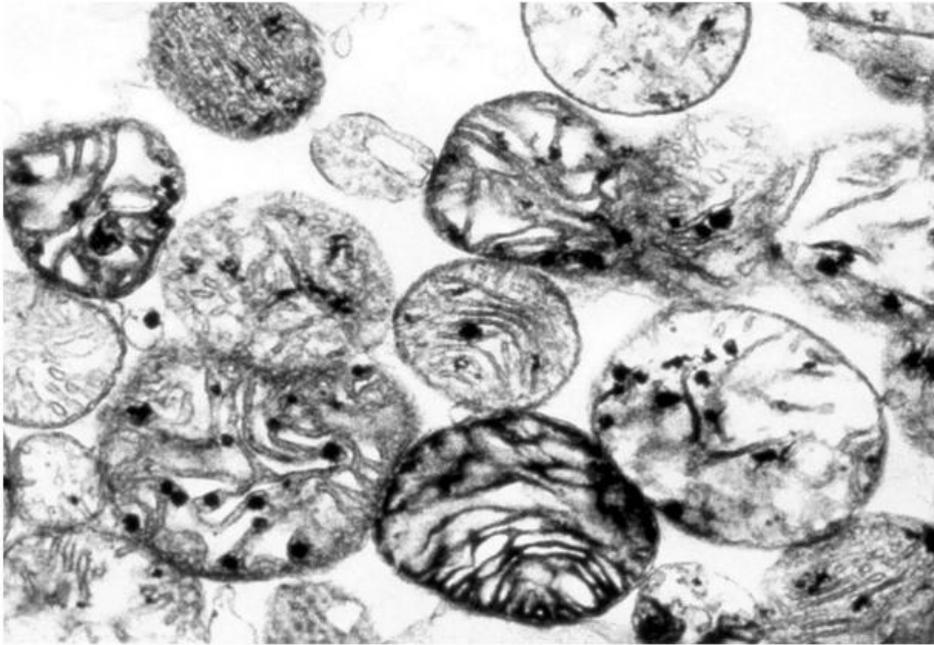


Рис 5-28. Частичное ингибирование процесса кальцинирования митохондрий в присутствии ионов Mg^{2+} . *Вверху*: электронномикроскопическое изображение митохондрий из сердца кролика подвергнутых кальцинированию *in vitro* в присутствии ионов Mg^{2+} . Наблюдаются лишь незначительные по объёму стяжения аморфного полифосфата (шаровидные образования и затенённые области в матриксе). Кристаллы отсутствуют. *Внизу*: кальцинирование митохондрий в аналогичных условиях в отсутствие ионов Mg^{2+} приводит к образованию крупных кристаллов апатита, разрушающих мембраны митохондрий.

Из работы [185].

Богатые фосфором и двухвалентными катионами везикулы гидрогеносом. На периферии почти всех гидрогеносом обнаруживаются от одной до трёх везикул, называемых *peripheral vesicles* или *membrane-associated inclusions*, слагаемых электронно-плотным материалом, окружённых двойной мембраной, Рис. 5-30 (f), [210, 211]. Анализ этих везикул (при помощи рентгеновского энерго-дисперсионного микроанализатора) из гидрогеносом *Tritrichomonas foetus* показал значительные

концентрации в них кальция, фосфора, магния и железа, [212]. Мембрана везикулы отличается от мембраны гидрогеносомы по своим химическим свойствам, [211].

Ввиду общности происхождения гидрогеносом и митохондрий, представляется разумным предположить, что *peripheral vesicles* гидрогеносом являются аналогом полифосфатных гранул митохондрий. Сходны округлая форма, состав, а также локализация этих образований. Везикулы обнаруживаются на периферии гидрогеносом, а гранулы митохондрий, напомним, обычно наблюдаются там, где внутренняя мембрана митохондрии непосредственно соприкасается с её внешней мембраной. Однако гранулы митохондрий мельче везикул и лишены мембраны. Авторы [210] обращают внимание, что по перечисленным признакам периферийная везикула гидрогеносом очень похожа на ацидокальциосому (обсуждаемую ниже). Вопрос о возможности проведения аналогий между гранулами митохондрий и везикулами гидрогеносом нигде, по-видимому, ранее не обсуждался.

5.9.4. Ацидокальциосомы.

Клеточная органелла с таким названием впервые была описана в трипаносомах сравнительно недавно, в 1994 г. Вскоре было осознано, что т.н. полифосфатные вакуоли водорослей и протист являются образованиями сходной природы. К настоящему времени детально исследованные полифосфатные вакуоли в паразитирующих микроорганизмах *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium spp.*, зелёной водоросли *Chlamidomonas reinhardtii* и слизевике *Dictiostelium discoideum*. Все они оказались ацидокальциосомами, [210]. Образования сходной природы имеются и у многих других эукариотов, включая человека. Высказывалось предположение, что и волютин бактерий тоже связан с ацидокальциосомой общностью происхождения, и если последнее предположение верно, ацидокальциосому следует признать единственную органеллой, общей для бактерий и эукариотов, [210, 213, 214].

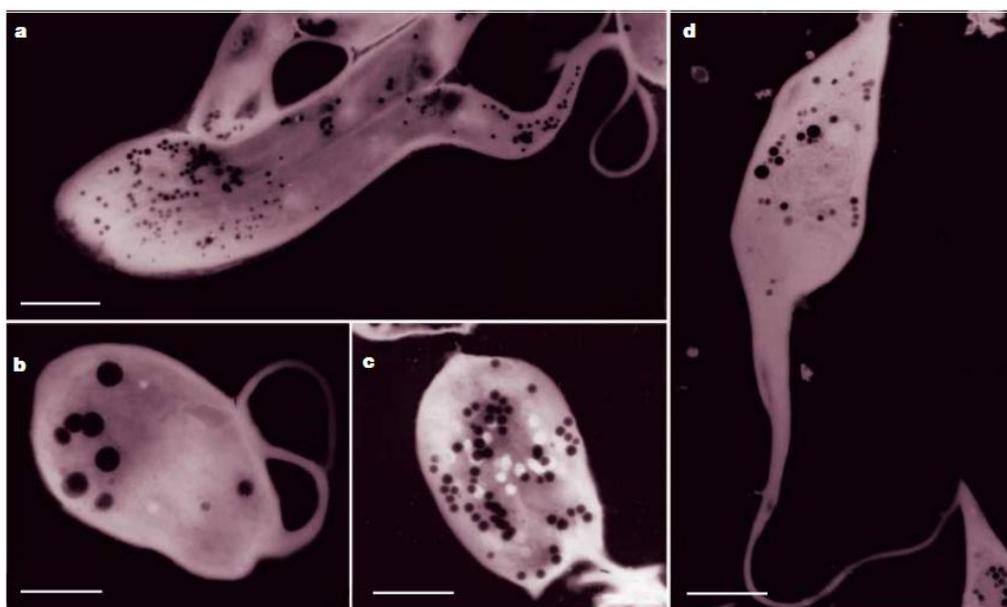


Рис 5-29. Морфология ацидокальциосом в трипаносоматидах. /Morphology of acidocalcisomes in whole trypanosomatids. Electron spectroscopic imaging (contrast tuning) of whole cells adhered to formvar-coated grids showing the shape, size and distribution of the acidocalcisomes (black spots) in different developmental forms of trypanosomatid species. **a** | Promastigote of *Blastocrithidia culicis* (scale bar 2 μm). **b** | Choanomastigote of *Crithidia deanei* (scale bar 1 μm). **c** | Amastigote of *Trypanosoma cruzi* (scale bar 1.5 μm). **d** | Epimastigote of *T. cruzi* (scale bar 2 μm). / Из обзора [214].

Строение и физиологические функции. Ацидокальциосомы представляют собой кислотные, богатые кальцием и polyP (в том числе пирофосфатом, PiP) органеллы округлой формы, диаметром обычно от 100 до 200 nm, окружённые двойной мембраной толщиной 6 nm, Рис. 5-30.

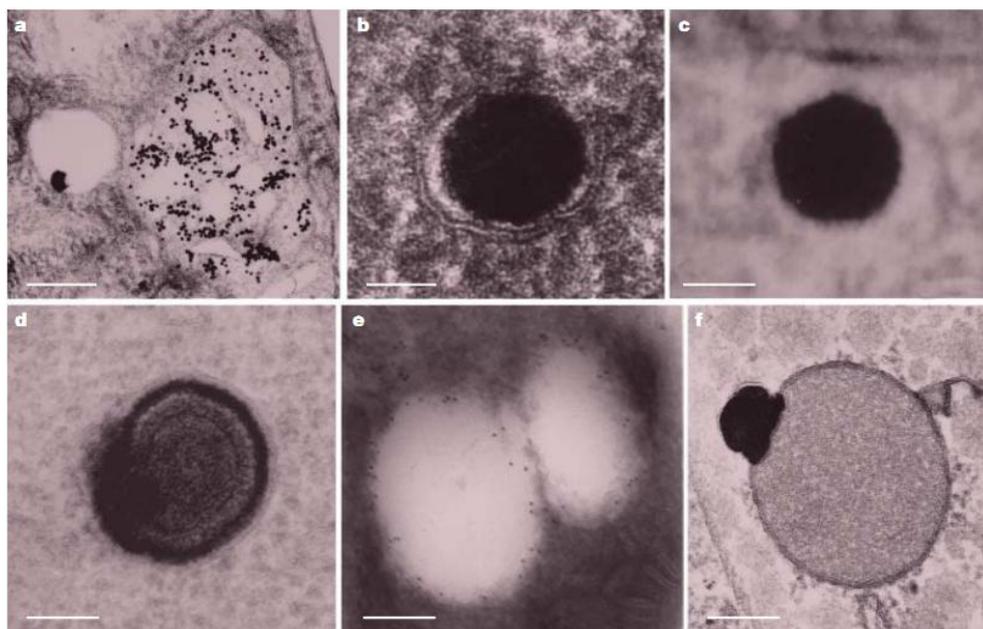


Рис 5-30. Электронно-микроскопические изображения тонких срезов ацидокальциосом приготовленных различными методами. На изображении **b** хорошо различима мембрана. На изображении **e**, полученном методом крио-иммуноэлектронной микроскопии, показано распределение насосов V-H⁺-PPase в мембране ацидокальциосомы из *Leishmania amazonensis*. На **f** изображена гидрогеносома из *Tritrichomonas foetus*. На периферии гидрогеносомы различимо электронно-плотное образование, отделённое от гидрогеносомы двойной мембраной. Это образование, «органелла органеллы», представляет собой аналог ацидокальциосомы.

/Thin sections of acidocalcisomes of trypanosomatid parasites prepared by different transmission electron microscopy methods and of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. Acidocalcisomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* submitted to chemical fixation followed by conventional embedding in epoxide resin (**a**), cryofixation by high-pressure freezing followed by freeze substitution and epoxide embedding (**b**) and cryofixation by immersion in ethane, cryosection and observation at low temperature (**c**). Note that the electron-dense material is better preserved with the use of cryomethods. Part **a** shows an acidocalcisome with an electron-dense inclusion and a vacuole of the endocytic pathway filled with endocytic tracers. Part **b** shows that a membrane surrounds the acidocalcisome. *Phytomonas francai* submitted to routine fixation and embedding in epoxide resin (**d**). Note the arrangement of the electron-dense material in concentric patterns in the acidocalcisome. **e** | Cryo-immunolectron microscopy of *Leishmania amazonensis* using antibodies raised against the V-H⁺-PPase. **f** | *Tritrichomonas foetus* hydrogenosome. Cells were fixed according to a glutaraldehyde-osmium tetroxide-potassium ferrocyanide procedure with 5 mM CaCl₂ added to all solutions. The electron-dense reaction product is visible in a vesicle-like structure (hydrogenosome vesicle) separated from the rest of the hydrogenosome, which has a double membrane. The scale bars represent 150 nm, 100 nm, 100 nm, 100 nm, 200 nm and 300 nm in parts **a-f**, respectively. /

Из обзора [214].

Отличительную особенность мембраны ацидокальциосом составляет характерный набор ионных насосов и ионообменников, имеется также, по крайней мере, один аквапорин. Список типичных насосов, описанных в мембране ацидокальциосом из различных организмов, включает кальциевые насосы Ca²⁺-ATPases, водородные насосы vacuolar-type H⁺-ATPase (V-H⁺-ATPase) и vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase (V-H⁺-PPase), [214]. Именно с ацидокальциосомами ассоциируется насос V-H⁺-PPase, [210, 213, 214, 215, 216], молекулярное ископаемое, описанный выше в разделе 5.7.2.1.

Матрикс ацидокальциосом отличается высокой электронной плотностью, вероятно вследствие высокой концентрации фосфора. В пучке электронов матрикс испаряется,

поэтому под электронным микроскопом препараты ацидокальциосом, изготовленные традиционными методами, обычно выглядят как пустые вакуоли с остатками электронно-плотного материала по краям, Рис. 5-30(а). Идентификация ацидокальциосом во многом стала возможна благодаря усовершенствованию методики криофиксации препаратов для электронной микроскопии, [210], Рис. 5-30 (b,c,e). Основные химические элементы, обнаруживаемые в матриксе, – это кислород, фосфор, кальций и магний, а также натрий, иногда цинк и железо. Состав катионов варьирует для разных видов, а также в зависимости от условий обитания.

Для всех ацидокальциосом характерны высокие концентрации как PiP, так и polyP с большей длиной полианиона, при этом количество фосфатных остатков в polyP для разных видов может варьировать. Общее содержание фосфатов в ацидокальциосоме оценивается в 3-8 моля (в пересчёте на ортофосфат). Помимо полифосфатов, эти органеллы содержат углеводы и липиды. Для них также характерны высокие концентрации свободных аминокислот. Содержание серы в ацидокальциосомах очень низкое, что говорит об отсутствии белков. Тем не менее, для некоторых организмов доказано присутствие ферментов в ацидокальциосомах, таких как пиродифосфат киназа, экзополифосфатаза, растворимая неорганическая пиродифосфатаза, [210].

Общей для всех ацидокальциосом чертой является их способность накапливать кальций при повышенной концентрации этого элемента в среде. Эта особенность сближает их с гранулами митохондрий.

Возможные биологические функции ацидокальциосом и их метаболизм обсуждаются в работах [210, 214]. Вопросы эти составляют часть упоминавшейся выше более общей проблемы выяснения функций и метаболизма polyP, в которой ещё очень много неясного. Новые ацидокальциосомы в трипаносоматидах, согласно авторам [210], образуются почкованием, см. Рис. 5-29(c,d).

Сходство ацидокальциосом с волютином. Волютиновые гранулы (называемые также полихроматическими гранулами) были первой субклеточной структурой, обнаруженной в бактериях. Позднее, они были идентифицированы в водорослях и протистах и переименованы в полифосфатные вакуоли, ввиду высокого содержания в них polyP.

Волютиновые гранулы бактерий сходны с ацидокальциосомами по химизму и морфологии, вследствие чего возник вопрос о возможных эволюционных связях между ними. В настоящее время вопрос этот не может быть решён однозначно, однако уже обнаружены две бактерии – *Agrobacterium tumefaciens* и *Rhodospirillum rubrum*, – волютиновые гранулы которых полностью аналогичны ацидокальциосомам, [217,215]. В частности, они тоже окружены двойной мембраной, в которой иммунолюминесцентным методом показано наличие характерного для ацидокальциосом водородного насоса V-H⁺-PPase. Тем самым, общность происхождения волютина и ацидокальциосом представляется весьма вероятной. В археях ацидокальциосомы пока обнаружены не были. Некоторые археи содержат волютин [213], но в силу его малой распространённости остаётся неясным, был ли он унаследован от общего предка или же позаимствован у бактерий или у эукариотов посредством горизонтального транспорта генов.

Древность ацидокальциосом. Авторы обзоров [213, 214], обработав имеющиеся данные об эволюции ацидокальциосом, пришли к выводу о необычайной древности этих образований. Эти органеллы обнаруживаются в филогенетически удалённых представителях эукариотов (помимо упоминавшихся выше трипаносоматид, токсоплазмы, малярийного плазмодия, хламидомонады и слизевика, они обнаружены также желтке куриных яиц [218] и в желтке яиц кровососущего клопа *Rhodnius prolixus* [219], в тромбоцитах человека). Поэтому они должны были присутствовать в общем предке всех эукариотов. Кроме того, именно с мембраной ацидокальциосом ассоциируется

обсуждавшийся ранее протонный насос V-H⁺-PPase, почтенная древность которого не подвергается сомнению.

Не вполне ясен вопрос о группе организмов, с которыми следует связывать возникновение ацидокальциосом и волютина. Волютин характерен для бактерий. Ацидокальциосомы обнаруживаются у эукариотов, сходство волютина и ацидокальциосом убедительно продемонстрировано авторами [210]. Поскольку археи содержат волютин намного реже, чем бактерии, можно предположить, что некоторые археи сравнительно недавно позаимствовали волютин у бактерий посредством горизонтального переноса генов. Вопрос о происхождении волютина архей отчасти проясняется при рассмотрении филогенетического дерева протонного насоса V-H⁺-PPase.

Тесная ассоциация протонного насоса V-H⁺-PPase с ацидокальциосомами и волютином может быть использована для выяснения природы волютина архей. В работе [213] было построено филогенетическое дерево генов, кодирующих гомологичные V-H⁺-PPase в археях, бактериях и эукариотах. Авторы делают вывод о наличии V-H⁺-PPase в общем предке бактерий, архей и эукариотов, поскольку гомологичные гены обнаруживаются во всех трёх доменах жизни. На мой взгляд, построенное авторами [213] филогенетическое дерево обнаруживает особенность, свидетельствующую в пользу заимствования белков V-H⁺-PPase археями. Если филогенетические взаимоотношения таксонов дерева генов, кодирующих гомологичные белки V-H⁺-PPase в археях, бактериях и эукариотах, построенного в [213], сопоставить с общепринятой схемой таксонов, построенной на основе анализа рибосомной РНК, то обнаруживается прекрасное соответствие филогенетических взаимоотношений для бактерий и эукариотов, а вот для многих архей такого соответствия не наблюдается. Последнее, как мне кажется, и есть манифестация горизонтального переноса генов V-H⁺-PPase от бактерий или эукариотов к археям. А это означает, что археи приобрели свой волютин посредством горизонтального переноса генов.

5.9.5. Обсуждение.

Явления, описанные в настоящем разделе, могут быть рудиментами древнего клеточного приспособления в виде кристалла апатита, используемого для стемпинга и трансляции. Молекулярные насосы, используемые для поддержания высокой концентрации ионов Ca²⁺ и (PO₄)³⁻ во внутриклеточных жидкостях, требуемых для насыщения их апатитом, действуют и поныне, с той разницей, что фосфат, ранее используемый для получения кристаллов минерала, теперь используется для синтеза polyP и органических фосфатов. Наглядным проявлением этих механизмов служит феномен кальцинирования бактерий и митохондрий, а также аналогичное ему накопление кальция в ацидокальциосомах при повышенных концентрациях Ca²⁺ в среде. Богатые polyP ацидокальциосомы эукариотов и волютин бактерий, вероятно, представляют собой видоизменения клеточной органеллы, некогда содержавшей кристалл апатита, использовавшийся для копирования полинуклеотидов стемпингом и (или) трансляции.

Можно предположить, что клеточная органелла, ставшая впоследствии ацидокальциосомой, изначально содержала кристалл или несколько кристаллов апатита, которые могли быть использованы для копирования полинуклеотидов или трансляции. Затем содержащий подобную органеллу организм обзаводился рибосомой или *bona fide* полимеразой посредством горизонтального переноса соответствующих генов. В результате организм более не имел надобности в кристаллическом апатите. Поэтому органеллы, его производящие, в одних организмах были утрачены, а в других перепрофилированы как синтезаторы и вместилища polyP, в то время используемого в качестве основного энергоносителя.

Принимая изложенную точку зрения на происхождение ацидокальциосомы и волютина эукариотов и бактерий, редкость подобных образований у архей, вероятно, указывает, что полимеразы предков архей не были получены путём заимствования у других организмов.

В следующем разделе предложен механизм возникновения полимеразы путём миниатюризации застрачиваемого апатитового кристалла, который не должен сопровождаться возникновением волютина. Полимераза, используемая предками архей (РНК-репликаза) могла возникнуть в таком процессе.

Интересно отметить, что используемая для выращивания апатитовых кристаллов органелла, впоследствии ставшая волютином бактерий и ацидокальциосомой эукариотов, сама по себе, могла возникнуть в результате эндосимбиоза – она могла быть веригоносцем, захваченным неким друзовиком. Судя по тому, что размножаются ацидокальциосомы в современных эукариотах почкованием, таким, вероятно, был и механизм размножения нашего веригоносца. Если это предположение верно, более детальное исследование мембраны ацидокальциосом позволит прояснить природу мембран древнейших организмов, возникших до появления бактерий и архей. До того, как стать органеллой, вследствие эндосимбиотического партнерства, наш веригоносец - в виде кристалла апатита, окруженного двойной мембраной, был очень похож на те организмы, чьи фоссилизированные остатки обсуждались ранее, в разделе 5.8.2.

5.10. Переход от стемпинга к полимеразам.

В современных организмах сборка полинуклеотидов осуществляется полимеразми – специализированными ферментами, большинство из которых представляют собой очень громоздкие, сложно устроенные макромолекулы. Структура многих полимераз известна с высокой степенью детальности. Известны и многие детали протекающих в них процессов. В настоящем разделе сделана попытка понять, в самых общих чертах, каким образом постепенные эволюционные усовершенствования незамысловатого устройства, содержащего кристалл апатита, синтезировавшего полинуклеотиды стемпингом, могли привести к появлению молекулярных машин, внешне ничего общего с ним не имеющих. Делается также попытка отыскать следы древнего каталитического механизма, основанного на стемпинге, в современных полимеразх.

Различают составные полимеразы (multisubunit polymerases), состоящие из нескольких субъединиц, и полимеразы не являющиеся составными. Составные полимеразы можно уверенно отнести к числу наиболее громоздких и сложно устроенных молекулярных приспособлений в природе. Все они являются ДНК-зависимыми РНК полимеразми, все катализируют транскрипцию, все связаны общностью происхождения. Мы будем называть их *составными РНК полимеразми*.

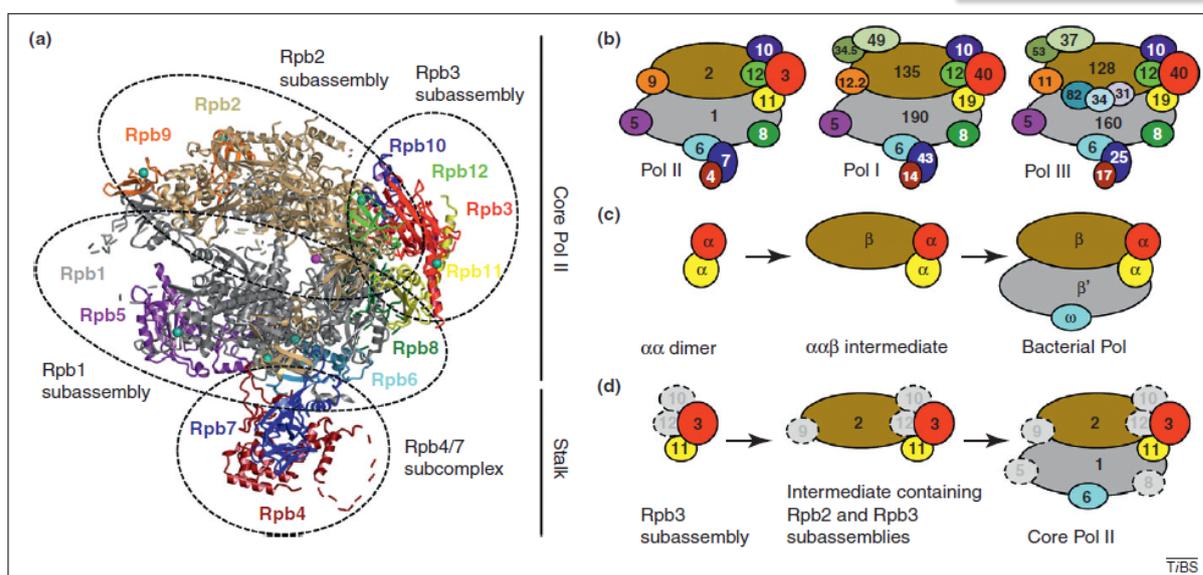


Рис 5-31. Структура составной РНК полимеразы и схема соединения субъединиц. /RNA polymerase subunit composition and assembly. (a) Crystal structure of Pol II. The polymerase core may be thought of as consisting of three subassemblies, the Rpb1 subassembly containing Rpb1, Rpb5, Rpb6 and Rpb8, the Rpb2 subassembly containing Rpb2 and Rpb9, and the Rpb3 subassembly containing Rpb3, Rpb10, Rpb11 and Rpb12. A stalk consisting of Rpb4 and Rpb7 protrudes from the core. Eight zinc ions and the magnesium ion at the active site are shown as cyan and pink spheres, respectively. Adapted from [5]. (b) Scheme of eukaryotic RNA polymerase subunit composition. Shared or homologous subunits of the three eukaryotic RNA polymerases (Table 1) are depicted in the same color. Subunits are labeled according to (a) and Table 1. (c) Assembly of bacterial RNA polymerase. Assembly starts with formation of an aa dimer, proceeds via an aab intermediate, and is completed by the addition of the b0 and v subunits. The subunits are colored according to their eukaryotic homologs in (b). The a subunit is homologous to Rpb3 and Rpb11 in Pol II, and to AC40 and AC19 in Pol I and Pol III. (d) Putative pathway for assembly of the Pol II core. Assembly may start with formation of the Rpb3 subassembly, proceed via association with the Rpb2 subassembly, and finish with addition of the Rpb1 subassembly. Subunits shown in light gray (with broken outlines) have no homologs in bacterial RNA polymerases. / Из обзора [784].

Эволюция и филогенетические взаимоотношения составных РНК-полимераз обсуждались выше, в разделе 5.4.1. Согласно данным филогенетического анализа [710], напомним, возникновение этой полимеразы восходит к предкам бактерий. Число субъединиц в молекуле может меняться от 12 до 17, причём возникла составная структура в глубокой древности. Согласно [224] молекула, являющаяся общим предком современных составных РНК-полимераз, уже содержала белки, гомологичные 12 субъединицам современной РНК-полимеразы.

Наибольшее распространение в природе имеют полимеразы, не являющиеся составными, молекулы которых по форме могут быть уподоблены «сложенной пригоршней ладони правой руки» (*a cupped right-hand palm*). В молекуле этой полимеразы различают блоки, именуемые тыльной стороной руки (palm), большой палец (thumb) и пальцы (fingers), Рис 5-32.

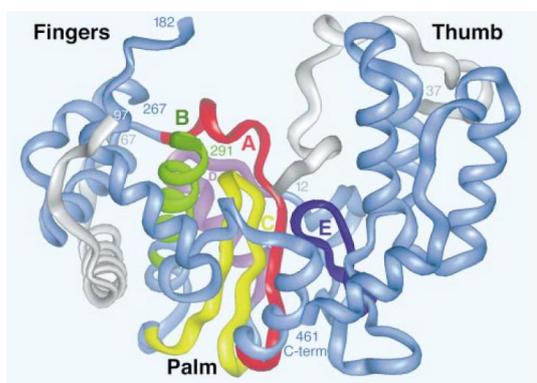
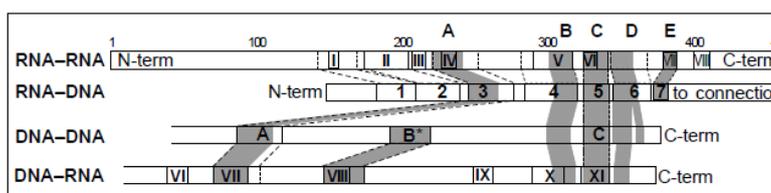


Рис 5-32. Структура молекулы РНК-зависимой РНК полимеразы вируса полиомиелита. Из работы [785].

Обсуждаемые полимеразы с молекулой в виде пятерни (*a cupped right-hand palm*) включают представителей всех четырёх возможных типов, т.е. и субстратом и синтезируемой молекулой может быть как РНК, так и ДНК. Их кодирующие последовательности обнаруживают частичную гомологию, распространяющуюся лишь на отдельные домены молекулы. О характере гомологии можно судить по диаграмме на Рис 5-33.



Amino acid sequence alignments for the four categories of nucleic acid polymerase. The numbers at the top of the figure refer to residue numbers of poliovirus polymerase. Sequence motifs within each category are enclosed with solid lines. These motifs are those described by Koonin [14] for positive-strand RNA viruses (RNA-RNA); Xiong and Eickbush [18] for

RNA-dependent DNA polymerases (RNA-DNA); DeLarue *et al.* [19] for Pol I and Pol α type DNA-dependent DNA polymerases (DNA-DNA); and Masters *et al.* [61] for the small single-subunit DNA-dependent RNA polymerases (DNA-RNA). Sequence-based alignments between the polymerase categories are designated by dashed lines; the sequence-

based alignments are those of Xiong and Eickbush [18] for RNA-dependent polymerases; DeLarue *et al.* [19] for DNA-dependent polymerases and for all four categories of polymerases. The structure/sequence motifs described in this paper are indicated by shading and are labeled A, B, C, D, and E which are the designations of Poch [17]. These alignments expand on sequence and structural alignments described previously [23,44]. Note that DNA-dependent polymerases contain a motif B (labeled B*) that is different from the motif B as designated by Poch for RNA-dependent polymerases; motif B as labeled here refers to a structure/sequence motif that occurs in all four categories of polymerase and corresponds to the C-terminal portion of motif B of Poch [17].

Рис 5-33. Графическое представление гомологичных доменов в кодирующих последовательностях полимераз четырёх типов с молекулой, состоящей из одной субъединицы со структурой «a cuffed right-hand palm».

Наибольшее сходство обнаруживают кодирующие последовательности РНК-зависимой РНК полимеразы и РНК-зависимой ДНК полимеразы (т.е. обратной транскриптазы, выше, в разделе 5.4.1 обозначенной как RT). Большинство исследователей уверены, что два эти семейства полимераз связаны общностью происхождения, [702,709,710, 785]. С другой стороны, последовательности, кодирующие ДНК-зависимые полимеразы, обнаруживают сходство между собой, [273, P_2,D_17]. В пределах домена palm обнаруживается т.н. core domain, содержащий активный центр, гомологичный для всех полимераз обсуждаемого семейства, [273,D_17].

Интригующей особенностью полимераз данного структурного типа является сходство строения и функций доменов молекулы разных полимераз в отсутствие гомологии. Томас Стейц, сопоставив структуры нескольких ДНК-полимераз, обнаружил в доменах thumb и fingers участки, имеющие у разных полимераз сходное строение и выполняющие идентичные функции, но не являющиеся гомологами, [237]. За 15 лет, прошедшие после публикации обзора [237], были определены структуры других полимераз данного структурного типа, подтвердивших наличие структурного сходства в отсутствие гомологии для отдельных доменов молекулы.

Известно не менее пяти структурных типов ферментов, способных катализировать образование фосфодиэфирной связи с образованием полинуклеотидов [709]. Молекулы некоторых из них, такие, например, как у изображённой на Рис 5-34 полимеразы семейства pol X, отличаются миниатюрностью и изяществом. Очевидно, происхождение этих полимераз имеет мало общего с происхождением громоздких макромолекул, монструозного облика, подобных изображённым на Рис 5-31 и 5-32.



Рис 5-34. Структура молекулы ДНК-полимеразы вируса африканской чумы свиней.

Ниже предложена схема возникновения громоздких полимераз, подобных изображённым на Рис 5-31 и 5-32. При изложении модели нам понадобятся некоторые общие сведения о белках, регулирующих нуклеацию и рост кристаллов. Эти сведения помещены в следующем подразделе.

Белки, регулирующие нуклеацию и рост кристаллов. Задача внутриклеточной минерализации решалась в природе бесчисленное множество раз. Широко известны и детально изучены такие белки, как остеокальцин, участвующий в регулировании процессов кальцинирования, амелогенин, регулирующий образование зубной эмали, белки-антифризы предотвращающие разрастание кристаллов льда. Существуют агенты, регулирующие образование кристаллов оксалата кальция, цитрата кальция, арагонита (CaCO_3), кристобалита (SiO_2), оксидов железа и ряда других соединений.

Регулирование процессов кристаллизации в природе, как правило, осуществляется белками, на поверхности глобулы имеющими участки, имитирующие элементы структуры соответствующего кристалла. Глобула остеокальцина, например, удерживает пять катионов Ca^{2+} , координируемых карбоксильными группами аминокислот, так что взаимное расположение катионов в точности воспроизводит их расположение в структуре апатита, Рис. 6-42. В белках-антифризах для той же цели используются остатки аминокислоты треонина, воспроизводящие расположение молекул H_2O на участке грани кристалла льда (размером до нескольких элементарных ячеек).

Механизм регулирования кристаллизации удобно иллюстрировать на примере белков-антифризов, потому что в данном случае имеется обширное семейство белков, не связанных общностью происхождения, принцип действия которых идентичен. Полипептиды этой группы предохраняют клетки многих нетеплокровных организмов от разрушающего воздействия кристаллов льда. Название «антифриз», как отмечают специалисты, не вполне отражает их физиологическую функцию, заключающуюся не в понижении температуры кристаллизации воды, а в предотвращении т.н. рекристаллизации льда (*recrystallization*). На начальной стадии процесса кристаллизации воды образуется большое количество мелких кристаллов льда. Затем имеет место рекристаллизация, состоящая в том, что некоторые кристаллы значительно увеличиваются в размере за счёт уменьшения и исчезновения других. Разрастаясь, такие кристаллы способны повредить мембраны клеток. Молекулы белков-антифризов связываются с гранями кристаллов льда, предотвращая их разрастание.

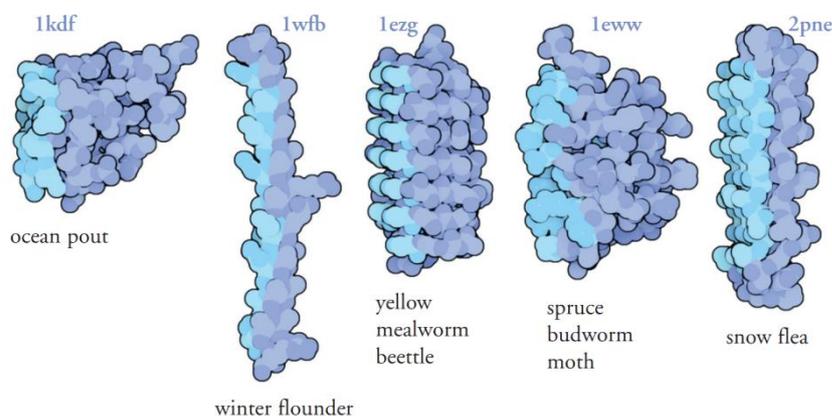


Рис 5-35. Белки-антифризы, выделенные из некоторых рыб и насекомых. Остатки треонина, имитирующие расположение молекул воды на грани кристаллов льда, показаны светло-голубым. Из обзора [225]

Белки-антифризы имеют небольшие молекулы, в которых всегда обнаруживается плоская поверхность, богатая остатками треонина. Молекулы нескольких таких белков, выделенные из рыб и насекомых, представлены на Рис. 5-35. Остатки треонина показаны светло-голубым. Способность связываться с кристаллом обусловлена закономерным расположением остатков треонина, воспроизводящим расположение молекул воды на грани кристалла льда.

Механизм регулирования кристаллизации посредством имитации полипептидом структуры соответствующего неорганического кристалла, по-видимому, является общим

феноменом. Создаётся также впечатление, что регулирование кристаллизации – это задача относительно простая. Молекула соответствующего белка-регулятора не должна совершать сложных пространственных перемещений, а субстрат – т.е. кристалл, с которым связывается белок, имеет простую, регулярным образом организованную структуру.

5.10.1. Механизм возникновения полимераз.

Рассмотрим сначала, как могли возникнуть полимеразы, подобно семейству полимераз в виде *right-hand palm*, (Рис 5-32), обнаруживающих частичную гомологию аминокислотных последовательностей, при которой имеется некий центральный блок, гомологичный для всех полимераз, а остальные блоки обнаруживают структурное сходство и, в отсутствие гомологии, выполняют аналогичные функции.

Мы полагаем, что в исходный момент времени организмы были наделены двумя типами молекулярных устройств, содержащими апатитовый кристалл. Первое устройство использовалось для полимеризации нуклеотидов (принцип действия описан в разделе 4.2), а второе для трансляции (принцип действия описан в разделе 5.5.2). В целях определённости будем считать, что процесс, осуществляемый первым устройством, был репликацией РНК. Оба устройства предполагаются эволюционирующими в направлении миниатюризации используемых ими апатитовых кристаллов (в силу причин, изложенных ниже), при существенных отличиях в характере эволюции. Первое устройство, реплицирующее РНК, предполагается изначально обеспечивающим достаточно высокий уровень принципу соответствия принципу комплементарности (*fidelity*), поскольку это заложено в механизме стемпинга (разъяснено в разделе 4.3). Транслирующее устройство предполагается изначально недостаточно совершенным, эволюционирующим в направлении совершенства и сложности синтезируемых полипептидов.

Представим себе кристалл апатита, используемый для полимеризации нуклеотидов стемпингом. На заре жизни, до появления рибозимов, кристалл должен был иметь длину, достаточную для размещения на нём всей реплицируемой молекулы. Грань, служащая основой, должна быть атомно-гладкой, поскольку при наличии дефектов поверхности молекула будет реплицирована с ошибками. Усложнение организмов в процессе эволюции вело к увеличению числа реплицируемых генов, а это в свою очередь – к удлинению кристалла. Укрупнение кристалла требует расходования ресурсов, а требование высокого совершенства грани-основы не позволяет использовать кристалл для других нужд, будь то в качестве резерва фосфата кальция, химического буфера или поглотителя токсичных ионов. Все мыслимые способы использования фосфата, подобные путям использования полифосфата в современных клетках, не могут быть задействованы без растворения части кристалла и ухудшения качества основы. На стадии веригиношения неудобства, происходящие от громоздкости используемых кристаллов, многократно усугубились, поскольку отягощённые каменной ношей существа были скованы в движениях. Отсюда следует, что способность организма к уменьшению задействованных в репликации и трансляции кристаллов должна была стать важным фактором отбора.

В процессе эволюции существ, реплицирующих РНК стемпингом апатита, должны были появиться рибозимы, регулирующие этот процесс. На стадии веригиношения должны были возникнуть рибозимы, регулирующие нуклеацию и рост апатитовых кристаллов. Вероятно, рибозимы, регулирующие рост кристалла, локализовались на одной его стороне, а стемпинг локализовалось на противоположной стороне. На той же стороне кристалла должны были располагаться и рибозимы, укладывающие РНК-матрицу в строчку основы, рибозимы, доставляющие нуклеотиды для полимеризации, рибозимы, катализирующие образование фосфодиэфирной связи, рибозимы, отделяющие синтезированную цепочку от основы и т.д.

Между тем, транслятор, непрерывно эволюционируя и совершенствуясь, был уже в состоянии произвести молекулы ферментов, выполнявшие соответствующие функции

лучше рибозимов. Поэтому, по мере совершенствования транслятора, имела место замена рибозимов белками. Вероятно, первым заменённым на белок рибозимом был тот, чья задача была проще. Наиболее простой среди технических задач, решаемых при регулировании стемпинга, была, скорее всего, задача регулирования роста апатитового кристалла.

Регулирование роста кристалла, как было выше указано, осуществляется посредством белков, частью глобулы имитирующих распределение электронной плотности некоторой грани соответствующего кристалла. Предположим, с одной стороны кристалла, используемого в качестве основы, располагались молекулы белка (или белков), имитирующей поверхность грани апатита.

Напомним, эволюция обсуждаемых организмов протекала в условиях, когда способность к уменьшению выращиваемых внутриклеточно апатитовых кристаллов была одним из факторов отбора. Вероятно, прежний дизайн реплицирующего устройства, когда реплицируемая макромолекула укореняется в основу по всей длине, а центр каталитической активности перемещается вдоль молекулы, был заменён новым, в котором катализ локализован в одном месте, а реплицируемая молекула продёргивается через этот центр, укореняясь в основу лишь в момент катализа и лишь в непосредственной окрестности каталитического центра. Смена дизайна позволила многократно уменьшить размеры задействованных в стемпинге кристаллов.

Уменьшение размеров кристаллов, используемых в качестве основы, напомним, должно было происходить на фоне постоянного совершенствования транслятора, производящего всё более совершенные белки. Степень совершенства белка, регулировавшего рост апатитового кристалла-основы, определялась точностью, с которой этот белок частью глобулы воспроизводил распределение электронной плотности грани кристалла апатита. Освоение этой функции в известном градусе совершенства, в соединении с общей направленностью эволюции на миниатюризацию выращиваемых апатитовых кристаллов, рано или поздно должно было привести к ситуации, когда репликация осуществлялась без участия кристалла имитирующими кристалл белками и прикрепленными к ним рибозимами. Возникшая таким образом полимеразы представляла собой рибонуклеопротеин.

Предположим, в ходе последующей эволюции организмы обсуждаемой группы распались на подгруппы, эволюционирующие более или менее независимо одна от другой. При этом продолжающееся совершенствование транслятора позволяло уже производить белки, не только пассивно воспроизводящие особенности апатитовой структуры, но и решающие более сложные задачи. Предположим, рибозимы, регулирующие детали процесса репликации РНК в составе нашей полимеразы – рибонуклеопротеина, один за другим заменялись белками. Распавшиеся на подгруппы организмы один и тот же рибозим заменяли разными белками, не обнаруживающими гомологии, но выполняющими аналогичные функции. Сходство функций и окружения должно было предопределить и сходство структуры соответствующих доменов получаемых полимераз.

В ходе последующей эволюции полимеразы могли быть подвергнуты дальнейшим видоизменениям. РНК-матрица могла быть заменена на ДНК, синтезируемая цепочка тоже могла быть изменена с РНК на ДНК. Эти замены осуществлялись сменой определённых блоков в молекуле полимеразы, но, ввиду структурно-химического сходства ДНК и РНК, новый блок выполнял сходные или аналогичные функции, и ввиду этого форма его и структура была сходны со структурой и формой заменяемого блока.

Предложенная схема объясняет возникновение семейства полимераз, подобных изображённой на рис 5-32, форму молекулы которых сравнивают с формой правой руки. Содержащий активный центр участок *core domain* в её *palm* мог возникнуть как белок, регулирующий рост кристалла. Поэтому участки соответствующие *core domain* в разных полимеразах оказываются гомологичными. Другие участки молекул возникли как

заменители рибозимов и потому обнаруживают сходство структуры и функций в отсутствие гомологии. Наиболее древними в этом классе белков многие авторы считают РНК-репликазу и филогенетически с ней связанную RT. Более высокая степень гомологии между РНК-репликазой и RT, по-видимому, показывает, что замена синтезируемой цепочки с РНК на ДНК могла быть осуществлена сравнительно небольшими изменениями в структуре молекулы. Замена же субстрата с РНК на ДНК с образованием ДНК-зависимых полимераз потребовала более существенных изменений в доменах *thumb* и *fingers*, поэтому единственным участком, гомологичным для всех полимераз семейства, остается *the core domain*. Тем не менее, замены субстрата, как и прежде, осуществилась без радикального изменения дизайна молекулы, формы и функций её доменов.

В описанном нами процессе могли возникнуть полимеразы, подобные пятерне, такие как изображенная на рис 5-32. Обратимся теперь к вопросу о происхождении составных полимераз, подобных изображённым на рис 5-31. Все ферменты этой группы, напомним, катализируют транскрипцию, тем самым возникли они уже после появления ДНК. Полимеразы этого семейства могли возникнуть в процессе, аналогичном вышеописанному, в результате миниатюризации кристалла-основы и замены его белком, с одним отличием – по всей видимости, на ранних стадиях эволюции, после возникновения ДНК, реакция транскрипции ДНК осуществлялась стемпингом апатита, но рибозимы в этой реакции деятельного участия не принимали. Вероятно, к моменту появления ДНК трансляция была освоена в степени совершенства, позволяющей синтезировать белковые ферменты в виде глобул. Поэтому регулирование процесса транскрипции осуществлялось белковыми глобулами. После миниатюризации апатитового кристалла и замены его белковой молекулой, вся конструкция полимеразы представляла собой нагромождение белковых глобул. В таком виде она и сохранилась по сие время.

Возможно альтернативное объяснение отличий составных полимераз от полимераз в виде пятерни. Можно предположить, что в отличие от реакции репликации РНК, осуществляемой стемпингом апатита при участии рибозимов, реакции транскрипции и(или) обратной транскрипции, осуществлялись при участии дезоксирибозимов (каталитически активных форм одноцепочечной ДНК, см. раздел 5.11.2). То есть конструкционные отличия двух классов громоздких полимераз могут быть следствием и каких-то общих отличий рибозимов от дезоксирибозимов.

Миниатюрные полимеразы подобные *pol X*, Рис 5-35, не могли возникнуть в описанном нами процессе. Эти полимеразы, вероятно, возникли уже после появления *bona fide* рибосомы. Их эволюционная история, скорее всего, непосредственно не связана ни с апатитом, ни с рибозимами.

Процесс эволюции трансляторов, завершившийся появлением современной рибосомы, мог быть во многом сходен с описанным здесь процессом возникновения полимераз. Изначально трансляция осуществлялась с использованием апатитового кристалла. Процесс регулировался рибозимами. Однако, в силу каких-то причин, миниатюризация апатитового кристалла до полного исчезновения не сопровождалась заменой рибозимов белками. В молекуле рибосомы, как хорошо известно, имеет место лишь инкрустирование молекул РНК небольшими белками. Можно предположить, что рибосома осталась рибозимом из-за того, что эволюция этого молекулярного устройства резко замедлилась после расселения его по всем доменам жизни. Подробно этот процесс обсуждается в разделе 5.5. Там, в частности, высказано предположение, что эффективная эволюция транслирующих устройств возможна только при наличии в каждом организме двух и более трансляторов, имеющих примерно равные характеристики. Рибосома, вероятно, кодировалась какими-то подвижными генетическими элементами, распространившими её по всем доменам жизни. Трансляторы, присутствовавшие в колонизируемой рибосомой организмах, существенно уступали ей в степени совершенства и потому были утрачены. В итоге рибосома оказалась единственным транслятором. Это привело к унификации

генетического кода, ускорению эволюции за счёт горизонтального переноса генов, однако эволюционное совершенствование рибосомы *per se* на этом закончилось.

Важно отметить ещё одну особенность описанного выше процесса миниатюризации кристалла в устройстве, используемом для полимеризации или трансляции – процесс этот не сопровождается появлением волютина или каких-либо подобных волютину стяжений фосфатов. В результате миниатюризации апатитового кристалла организм обзаводится молекулярной машиной, не содержащей кристалла. Кристалл попросту исчезает в этом процессе. Образование волютина, ацидокальциосомы или какого-либо иного стяжения фосфатов возможно, если организм, не имевший полимеразы или рибосомы, осуществлявший соответствующие реакции стемпингом апатита, обзавелся этим ферментом посредством горизонтального переноса генов. В этом случае содержащее кристалл громоздкое устройство, используемое ранее для полимеризации нуклеотидов или аминокислот, перепрофилируется как хранилище полифосфатов. Отсутствие фосфатных стяжений подобных волютину у большинства архей, поэтому, может быть проинтерпретировано как свидетельство возникновения РНК-репликазы и рибосомы в домене предков архей.

Гипотеза о возникновении полимераз посредством миниатюризации апатита-основы имеет ещё один аспект. Если излагаемая схема возникновения двух классов полимераз верна, если обе полимеразы возникли в сходных процессах, тогда и в строении их должны присутствовать определённые черты сходства. Наличие таковых черт (при всех фундаментальных различиях структур) показано в следующем разделе.

5.10.2. Некоторые закономерности строения полимераз.

Описанный выше процесс возникновения полимераз путём миниатюризации и постепенного удаления апатитовой основы, с заменой кристалла на белок, кристалл имитирующий, мог оставить какие-то следы в структуре и свойствах полимераз современных. Такие следы действительно обнаруживаются в особенностях структуры их активного центра, а также в механизмах обеспечения высокого уровня соответствия принципу комплементарности.

Строение активного центра. В описанном выше процессе белок, контролирующий формирование апатитового кристалла, имитирующий структуру грани кристалла апатита, используемую в качестве основы, постепенно подменяет собой кристалл. Отсюда следует, что полимеразы может содержать домен, строением напоминающий строение белков-регуляторов апатитовой минерализации, причём домен этот должен содержать активный центр, катализирующий образование фосфодифирной связи, или находиться непосредственно вблизи этого центра. Выше уже было упомянуто, что белки, регулирующие рост кристаллов апатита, обычно содержат на поверхности глобулы остатки аминокислот с кислотными группами, имитирующими расположение фосфатных групп в апатите. Разумно поэтому ожидать обнаружения вблизи активного центра аминокислот с кислотными боковыми цепями.

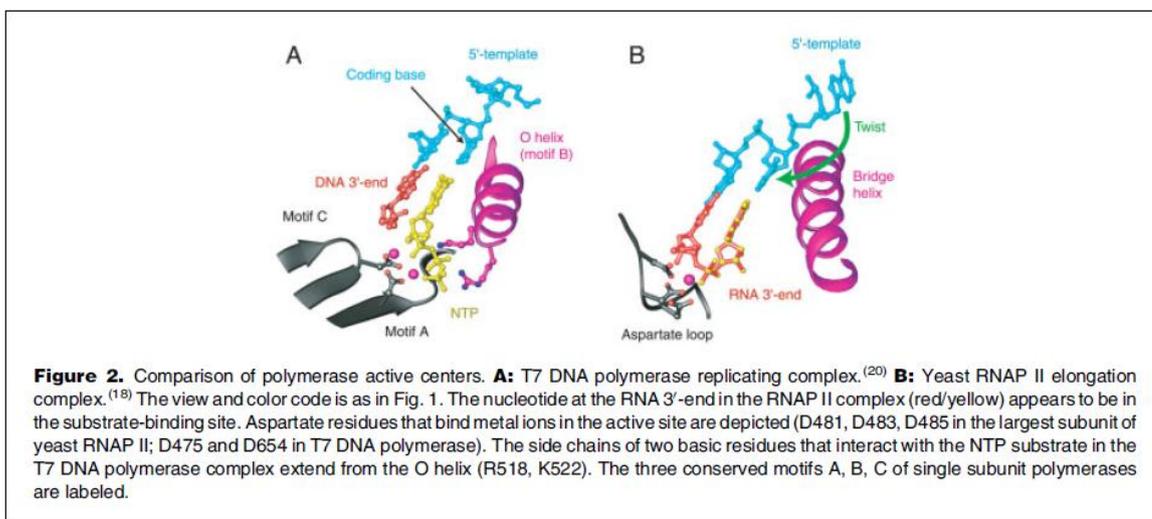


Рис 5-36.

На Рис 5-36 показаны схемы строения активных центров двух полимераз разных структурных типов. Рисунок позаимствован из обзора [788], составленного П. Крамером. Данный автор сопоставляет детали строения полимераз с целью выявления закономерностей общих для разных структурных типов. Активный центр полимераз, не являющихся составными и имеющих форму правой руки, подобных изображённой на Рис 5-32, содержит т.н. аспарагиновую петлю (aspartate loop), три остатка аспарагиновой кислоты, кислотными боковыми цепями координирующие два двухвалентных катиона, обычно Mg^{2+} , Рис 5-36 В. Активный центр составной полимеразы, подобной изображённой на Рис 5-31(а), имеет аналогичное строение, Рис 5-36 А. Сходство в строении в строении активных центров в отсутствие гомологии автор объясняет конвергентной эволюцией.

Внимание П. Крамера привлекло также то обстоятельство, что структурные элементы активного центра составной полимеразы располагаются в двух больших субъединицах. Автор задаётся вопросом, какого рода эволюционный процесс мог привести к появлению подобной конфигурации? В самом деле, для поддержания активности центра пространственное расположение карбоксильных групп необходимо координировать с точностью до десятых долей ангстрема. Автор полагает, что изначально обе субъединицы представляли собой одну полипептидную цепь.

Очевидно, сходство в строении активных центров проще объяснить, предположив, что активный центр полимеразы – это и есть искомый структурный элемент, имитирующий расположение фосфатных групп в апатите, ранее использовавшийся для нуклеации и выращивания апатитового кристалла. Расположение элементов активного центра составной полимеразы в разных субъединицах тоже не должно вызывать удивления, коль скоро их пространственное расположение изначально задавалось расположением двух соседних катионов на грани кристалла апатита. Однако возникают и вопросы: во-первых, обсуждаемый домен слишком мал в сравнении с соответствующим доменом остеокальцина, например, координирующим пять катионов Ca^{2+} , а не два. Во-вторых, в центре обычно обнаруживается магний, не входящий в состав апатита. Наконец, недоумение вызывает тот факт, что искомый структурный элемент – это и есть активный центр, а не домен вблизи центра. Для разъяснения указанных вопросов нам понадобятся некоторые сведения о ферментах, катализирующих реакции переноса фосфата.

С химической точки зрения, реакция образования фосфодиэфирной связи, катализируемая полимеразой, есть пример обширного класса химических превращений, именуемых реакциями переноса фосфата. Рассмотрение деталей строения активных центров ферментов, катализирующих реакции этого класса, выполненное в главе 9

настоящей работы, показывает, что центры эти бывают двух основных типов: центры, содержащие имидазольные группы (раздел 9.1.1) и центры, содержащие два иона металла (раздел 9.1.2). Кроме того, возможны центры, комбинирующие обе каталитические стратегии, (раздел 9.1.3). Активные центры полимераз, очевидно, относятся ко второму из перечисленных типов. Кристаллические структуры ряда ферментов с атомами металла в активном центре были расшифрованы с разрешением, допускающим сопоставление межатомных расстояний с межатомными расстояниями в кристаллических фосфатах (пока невозможным для полимераз ввиду крупности молекул). Такие сопоставления приводят к выводу, что в активном положении, когда фосфатная группа помещается между двумя катионами, взаимная конфигурация катионов и фосфата по существу представляет собой фрагмент структуры апатита. Однако вместо Ca^{2+} в центрах обнаруживаются катионы с меньшим (чем у Ca^{2+}) ионным радиусом, такие как Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+} . Экспериментально установлено, что при помещении двух катионов Ca^{2+} в активном центре его каталитическая активность утрачивается.

В свете этих данных изложенный выше процесс миниатюризации апатитового кристалла, завершившийся образованием полимеразы, может быть детализирован следующим образом. Изначально белок, регулирующий рост апатитового кристалла, подобно остеокальцину, имел на поверхности глобулы домен с несколькими кислотными группами, в количестве достаточном для регулирования процесса кристаллообразования. После истончения и исчезновения кристалла тот же домен использовался какое-то время как заменитель кристалла, своего рода трафарет, обеспечивающий постоянство ширины образуемой пары нуклеотидов и тем самым способствующий безошибочному копированию наследственной информации. Затем, при случайной замене Ca^{2+} на Mg^{2+} проявилась и была эволюционно закреплена каталитическая активность домена. Впоследствии были выработаны и другие, более эффективные, механизмы соблюдения принципа соответствия (fidelity). Поэтому способность домена имитировать геометрические свойства кристалла более не требовалась для успешной полимеризации, и большая часть его кислотных групп была утрачена, а число координируемых катионов сократилось до двух – ровно столько требуется для поддержания каталитической активности.

Ещё один структурный мотив, присутствующий в полимеразах, происхождение которого, по крайней мере, в принципе, может быть связано с апатитом – это т.н. цинковые пальцы (zinc fingers). Так называют небольшой белковый мотив с одним или двумя катионами Zn^{2+} , координируемыми боковыми цепями аминокислот, [789]. Цинковые пальцы часто являются факторами, связывающими РНК и ДНК. Цинк, в отличие от магния, способен в заметных количествах замещать кальций в апатите. В целом это достаточно редкий металл. Широкое его использование в составе белков может быть связано с тем, что на раннем этапе эволюции жизнь концентрировалась вблизи геотермальных источников, для которых характерны повышенные концентрации цинка.

Ориентация полинуклеотида в полимеразе. Наличие хиральности у молекулы рибозы, входящей в состав нуклеотидов, приводит к тому, что, фигурально выражаясь, у молекул полинуклеотидов имеется «верх» и «низ». Вследствие этого противоположные стороны молекулы двухцепочечного полинуклеотида, будучи химически неэквивалентными, по-разному взаимодействуют с раствором, и это проявляется в форме двойной спирали и в её структурных свойствах. Две противоположные стороны спирали полинуклеотида называют бороздками, соответственно, большой и малой, потому что они имеют разную глубину.

Будучи хиральными, молекулы рибоз должны по-разному взаимодействовать с поверхностью апатита при хемосорбции нуклеотидов. Поэтому молекулы полинуклеотидов всегда будут контактировать с поверхностью какой-то одной стороной, соответствующей более стабильной конфигурации. В итоге, в описанном выше процессе

трансформации апатитового кристалла в полимеразу ориентация молекулы полинуклеотида оказывается фиксированной по отношению к кристаллу. А геометрия дизайна, когда белок, регулирующий рост кристалла, находится с одной стороны, а рибозимы и (или) белки, регулирующие полимеризацию, находятся с противоположной стороны, должна быть сохранена в образуемых полимеразах. Поэтому, после постепенной замены кристалла белком, молекула синтезируемого полинуклеотида оказывается определённым фиксированным образом ориентирована по отношению к элементам полимеразы.

В цитируемом выше обзоре [788] П. Крамер отмечает, что во всех случаях, когда имеются структурные данные для полимераз в комплексе с матрицей и синтезируемым полинуклеотидом, все взаимодействия осуществляются со стороны малой бороздки. Сам автор полагает, что при взаимодействиях с противоположной стороны проявилась бы нежелательная зависимость характера взаимодействия от азотистого основания (нуклеотида). Проще, как мне кажется, предположить, что сторона, соответствующая большой бороздке, была обращена к кристаллу апатита, а после к белку, кристалл имитирующий, и потому во взаимодействиях участвовать не могла.

5.10.3. Геометрическая селекция.

Одно из основных положений предлагаемой теории Происхождения состоит в том, что процесс стемпинга обладает высокой селективностью, позволившей обойти проблемы, связанные с феноменом комбинаторного взрыва. Селективность происходит от комбинирования двух ограничительных принципов: необходимости гомологии водородных связей в уотсон-криковских парах и необходимости соответствия геометрических параметров синтезируемого двухцепочечного полинуклеотида параметрам решётки апатита основы (см раздел 4.3). На ранних этапах эволюции комбинирование этих же двух ограничительных принципов обеспечивало высокую степень соответствия принципу комплементарности (*fidelity*), необходимую для правильной передачи наследственной информации. Если предлагаемая теория верна, и если верна предлагаемая выше схема возникновения полимераз вследствие эволюции белка, имитирующего фрагмент апатитовой структуры, тогда и высокая степень *fidelity* современных полимераз должна быть явлением сходной природы.

Природные полимеразы обеспечивают высокую точность считывания информации кодируемой матрицей. Вопрос о задействованных молекулярных механизмах дискутируется уже не один десяток лет. После открытия структуры ДНК Уотсоном и Криком в 1953 г. было принято считать, что передача наследственных признаков всецело основана на гомологичности водородных связей в парах А·Т и G·C. Прямые замеры энергии этих связей не могут быть выполнены, поскольку она составляет лишь часть общей энергии взаимодействия двух цепочек полинуклеотидов в ДНК (Подробно энергетика взаимодействий в двухцепочечных полинуклеотидах обсуждается ниже в главе 10). Верхняя оценка энергии, полученная из величины температуры денатурации, составляющая 0.2 – 4.0 kcal/mol, несомненно, завышена. Значительные отличия величины температуры денатурации, замеренной для полимера polyd(A,T) от аналогичной температуры для polyd(A)·polyd(T) и аналогичные отличия для полимеров polyd(G,C) и poly(G)·poly(dC) показывают, что стэкинг вносит не меньший, а возможно и больший вклад в энергию взаимодействия нуклеотидов в уотсон-криковских парах. Однако оценки степени соответствия принципу комплементарности (*fidelity*), рассчитанные по формуле Больцмана даже с завышенными оценками энергии водородных связей, предсказывают значения на два порядка ниже наблюдаемых. Тем самым, гомология водородных связей не обеспечивает наблюдаемой степени соответствия.

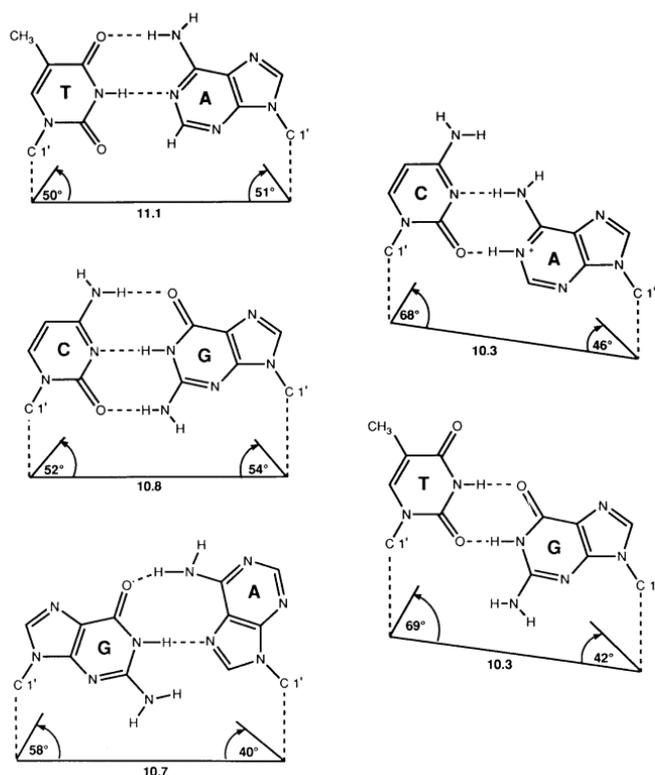


Рис. 5-37. Сравнение геометрических параметров уотсон-криковских (*справа*) и неканонических (*слева*) пар нуклеотидов. Рисунок основан на расшифровках кристаллической структуры олигонуклеотидов двухцепочной В-ДНК. С геометрической точки зрения уотсон- криковские пары А·Т и G·С практически идентичны. Неканонические пары А·С wobble, G·Т wobble и G(*anti*)·А(*syn*) имеют отличные значения углов и длин связей. *Из статьи [226]*

Высказывались предположения, [227,228,229], что высокая селективность полимераз, обеспечивающая высокие уровни *fidelity*, основана не на гомологии водородных связей в уотсон-криковских парах (и отсутствии гомологии в остальных парах), а на геометрических свойствах пар. В частности, автор [226] обращает внимание на поразительное сходство длин и углов связей в парах А·Т и G·С, в то время как для неканонических пар А·С wobble, G·Т wobble и G(*anti*)·А(*syn*) эти параметры существенно отличаются, Рис. 5-37. Отличия геометрических параметров пар, по крайней мере, в принципе, могут быть использованы полимеразой для отбраковки пар, которые не являются каноническими. Данный принцип получил название принципа геометрического или стерического отбора (*geometric selection, steric selectivity*).

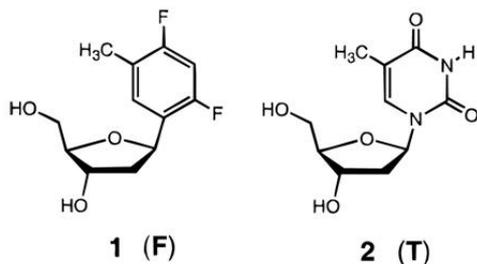


Рис 5-38. Дезокситимидин (справа) и его стерический аналог, не образующий уотсон-криковской пары с аденином (слева).

Попытка экспериментальной проверки принципа геометрического отбора была предпринята авторами [230, 231], синтезировавшими необычный нуклеотид, по своим геометрическим параметрам (форме и размерам) аналогичный тимину, но не способный к образованию уотсон-криковской пары (с аденином). На Рис 5-38 это нуклеотидоподобное

соединение показано слева и обозначено буквой F. Мы далее будем обозначать его символом dF (поскольку оно представляет собой аналог дезоксинуклеотида).

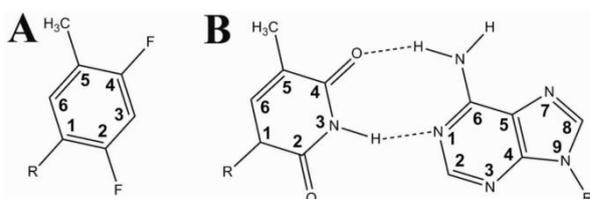


Рис. 5-39. (A) 2,4-Difluorotoluene; (B) Пара комплементарных оснований Т·А.

В качестве азотистого основания в dF присутствует 2,4- difluorotoluene, Рис. 5-39(A). По своим геометрическим свойствам пиримидиновое кольцо dF аналогично тимину, но, вследствие замены двух атомов кислорода на фтор, оно в водной среде не образует водородных связей с азотистыми основаниями нуклеотидов.

Определение температуры денатурации двухцепочечных олигомеров показало, что, по крайней мере, в водном растворе, замена dT на dF оказывает дестабилизирующее влияние, т.е. приводит к нарушению водородных связей. В то же время детальные спектроскопические исследования двухцепочечных олигомеров ДНК с заменами dT на dF, выполненные авторами [232], подтвердило сходство геометрии пар dA·dT и dA·dF.

Для проверки принципа геометрического отбора авторы [230, 231] исследовали возможность синтеза ДНК полимеразми при замене dT на dF. В цитируемых работах для синтеза ДНК использовался фрагмент Клёнова (фрагмент ДНК-зависимой ДНК полимеразы, обладающий активностью полимеразы). Впоследствии были испробованы и другие полимеразы. Как оказалось, указанная замена не нарушает работы полимераз. Использование содержащей dF ДНК-матрицы на работе полимеразы практически не сказывается. Синтез соответствующей реплики из природных нуклеозидтрифосфатов осуществляется эффективно и с тем же уровнем *fidelity*, то есть с преимущественным образованием пар А·F. Синтез ДНК с использованием ДНК-матрицы из природных нуклеотидов из раствора, содержащего нуклеозидтрифосфаты с частичной или полной заменой dTTP на dFTP тоже протекает успешно, причём dT и dF обнаруживают взаимозаменяемость. Инкорпорирование F, т.е. образование пары А·F случается лишь в 40 раз реже образования стандартной пары А·Т (тогда как для неканонических пар G·Т, А·С, G·А это отношение составляет $10^{-3} - 10^{-6}$). Указанные тенденции воспроизводятся при варьировании нуклеотидного состава матрицы и праймера, [230,231,233].

Тот факт, что пары А·F при репликации образуются с вероятностью, лишь в 40 меньшей вероятности образования стандартной пары А·Т, некоторыми специалистами был воспринят как свидетельство несущественности водородных связей в уотсон-криковских парах для обеспечения *fidelity* при репликации. Автор [226] активно способствовал популяризации представления о геометрическом отборе как о главнейшем, если не единственном, факторе, определяющем *fidelity* при репликации ДНК. Были у такой точки зрения и критики, полагавшие, что отсутствие водородных связей в паре А·F не было доказано. В самом деле, резкое понижение температуры денатурации двухцепочечных олигомеров ДНК с такими парами говорит лишь о невозможности образования водородных связей в водном растворе, но не доказывает отсутствия их в паре, помещённой в отличающиеся от раствора условия вблизи активного центра полимеразы. Несколько лет назад признаки образования водородных связей в паре А·F действительно были обнаружены экспериментально при расшифровке кристаллической структуры олигомеров двухцепочечной ДНК содержащей dF, [234]. Авторы цитируемой работы, впрочем, не отрицают значения геометрического отбора. Они подчеркивают, что гомология водородных связей и соответствие формы и размеров составляют два необходимых условия успешного функционирования полимераз. Тем самым принципы

обеспечения *fidelity* в современных полимеразах, при всей сложности этих органических молекул, действительно совпадает с постулируемым нами принципом комбинирования геометрических критериев с гомологией водородных связей в процессе стемпинга кристаллического апатита.

5.11. Возникновение эукариотов.

... Кто же, позвольте вас спросить, создал вот эти деревья...
Дон Жуан, или Каменное пиршество. Мольер.

Вопрос о происхождении эукариотов составляет одну из центральных проблем эволюционной биологии. Геномы эукариотов обнаруживают черты сходства с геномами архей и геномами бактерий. Задача тем самым сводится к угадыванию процесса или явления, возможно, очень необычного, в котором участвуют бактерии и эукариоты (или их предки), способного привести к возникновению существа, чья последующая эволюция могла бы привести к возникновению особенностей геномики, цитологии, молекулярной биологии эукариотов, а также присущего им полового способа размножения. До сих пор не было предложено теории, с единых позиций объясняющих основные факты. Ниже показано, что загадка происхождения эукариотов проясняется, если принять во внимание сделанные нами ранее выводы о природе предков архей и предков бактерий, их жизненных циклах, а также жизненных циклах обитавших в предках бактерий мобильных генетических элементов. Попутно объясняется механизм возникновения двухцепочечной ДНК и современного жизненного цикла, основанного на комбинировании репликации ДНК с транскрипцией, а также возникновение удивительных молекулярных механизмов, сообщающих свойство мобильности интронам группы I (*homing endonucleases*) и интронам группы II (*retrohoming*). Факты, подлежащие объяснению, излагаются в следующем ниже разделе 5.11.1, а следующий за ним раздел 5.11.2 посвящён их интерпретации.

Поскольку вопросы, обсуждаемые в данном разделе, составляют некоторое отступление от основной темы настоящей работы, заключающейся в уяснении механизмов полимеризации нуклеотидов древнейшими организмами, мы не станем углубляться в обзор многочисленных сценариев происхождения эукариотов, предложенных предыдущими авторами. Мы также не станем углубляться в обсуждение всех возможных способов объяснения того или иного явления, из числа описанных ниже. Наша цель в том, чтобы предложить хотя бы один непротиворечивый сценарий происхождения эукариотов, хотя в действительности версия, излагаемая ниже – лишь одна из нескольких возможных.

5.11.1. Факты, подлежащие объяснению.

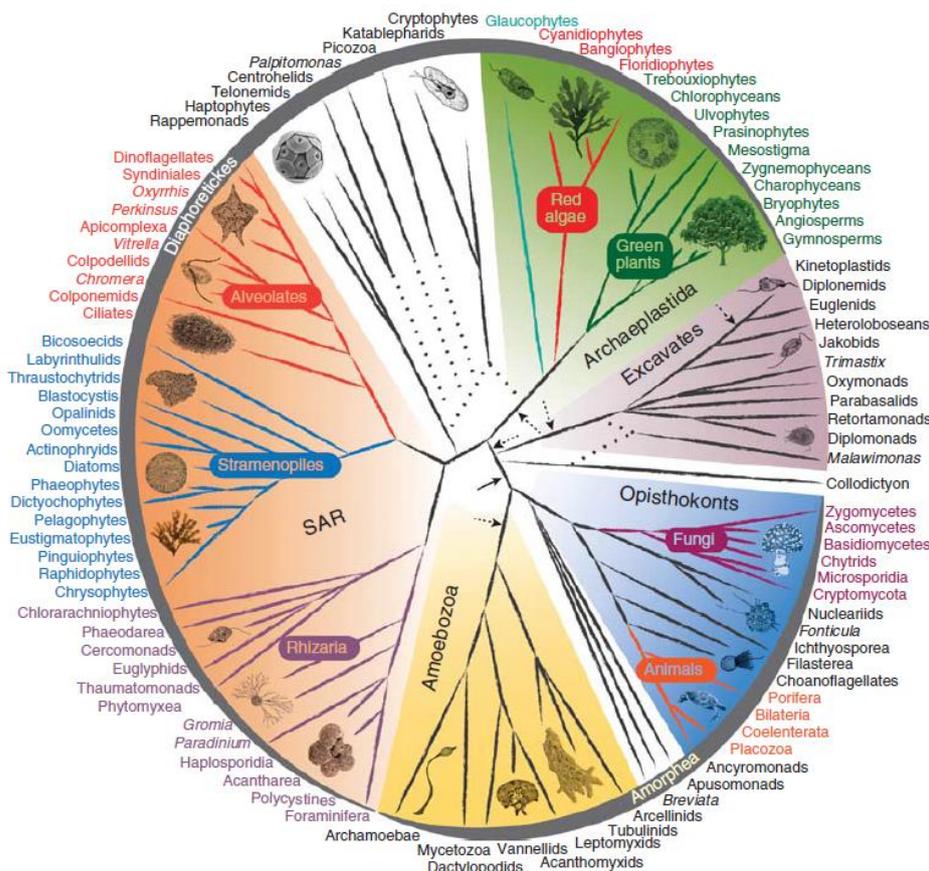
Происхождение эукариотов исследовалось и обсуждалось большим количеством авторов с разных точек зрения. Многие из излагаемых здесь вопросов, на которые гипотеза происхождения должна дать ответ, сформулированы в результате коллективного усилия разных групп специалистов. В целях краткости, ссылки в тексте даны лишь на отдельные работы, в которых можно найти подробное изложение соответствующего вопроса и библиографию.

Сходство эукариотов с археями и бактериями в отсутствие промежуточных форм.

Геномы эукариотов могут быть разложены на три неравные части: гены, несомненно, происходящие от архей, гены вероятного бактериального происхождения и гены, не имеющие гомологов ни у тех, ни других. Гены, кодирующие рибосому и белки, участвующие в репликации ДНК, транскрипции, трансляции и сплайсинге имеют

гомологов в домене архей. В частности, на филогенетическом древе малой субъединицы рибосомы, которое ряд авторов ещё называют «филогенетическим древом жизни» (*the phylogenetic tree of life*), ветвь эукариотов представляет собой ответвление от ветви архей, Рис 5-2. Однако в целом количество генов, происходящих от бактерий, как минимум, втрое превосходит число генов архейского происхождения, [794]. При наличии несомненных связей с археями и бактериями, эукариоты, все без исключения, обнаруживают уровни клеточной организации, на которые ни археи, ни бактерии сами никогда способны не были. В природе не обнаружено переходных форм – каких-либо организмов, занимающих промежуточное положение между археями и (или) бактериями, с одной стороны, и эукариотами, с другой, будь то с точки зрения клеточной организации или состава и структуры геномов, [794].

Эволюционный Big Bang. Филогенетический анализ геномов приводит к выводу о происхождении всех эукариотов от единого предка, уже обладавшего всеми характерными особенностями эукариотов. Исследованные геномы эукариотов распадаются на шесть групп, именуемых *Opisthokonta*, *Amoebozoa*, *Excavata*, *Archaeplastida*, *Rhizaria* и *Chromalveolata*. Характер ветвления филогенетического древа, Рис 5-40, свидетельствует о более или менее одновременном возникновении всех шести групп, с последующим очень быстрым развитием, словно эволюция эукариотов на ранней стадии развития имела взрывной характер. Явление это иногда называют *evolutionary Big Bang*, [794,795].



3

Рис 5-40. Сводное филогенетическое древо эукариотов, построенное на основании данных филогенетического анализа, данных о наследовании редких мутаций и о морфологических характеристиках. Пунктиром показаны взаимоотношения, не прояснённые окончательно, либо находящиеся в противоречии с другими, столь же убедительными. Стрелками указаны пять вариантов укоренения филогенетического древа, предложенные в результате использования различных методов анализа. Из обзора [795].

Трудности с укоренением филогенетического древа. Несмотря на обилие данных, попытки локализовать корень филогенетического древа и тем самым прояснить, какого рода существо является единым предком всех эукариотов, не увенчиваются успехом. Результат обнаруживает существенную зависимость от используемого метода анализа филогенетических данных, [794,795]. К настоящему времени (по состоянию на 2014 г.) предложено пять вариантов укоренения древа, показанные стрелками на Рис 5-40. Зависимость локализации корня филогенетического древа от способа анализа, видимо, отражает некие специфические особенности эволюции эукариотов, в анализе не учитываемые, которые пока выявлены не были.

«Мистическое» слияние. Не вызывающая сомнений связь эукариотов с бактериями и археями, в отсутствие каких-либо промежуточных форм, вызвала к жизни представления о происхождении эукариотов от единственной клетки, возникшей вследствие некоего слияния двух клеток, одна из которых была археей, другая бактерией, [794,796,797].

Клетки эукариотов, все без исключения, содержат митохондрию (или её редуцированный вариант – гидрогеносому, митосому). Эндосимбиотическое происхождение митохондрии ныне общепризнанно. Геном митохондрий схож с геномом риккетсий – мелкой специализированной формой бактерий, ведущих паразитический, внутриклеточный образ жизни. Некоторые авторы полагают, что родоначальная клетка эукариота возникла в результате эндосимбиоза риккетсии и некоей археи. Однако геном риккетсий редуцирован, вероятно, вследствие паразитизма. Набор генов эукариотов, обнаруживающих сходство с генами бактерий, выходит далеко за рамки того, что могло бы быть позаимствовано у риккетсий, [794]. Поэтому большинство авторов, разделяющих представления о происхождении эукариотов путём слияния клеток археи и бактерии (обычно предполагается, что бактерия была захвачена археей, например, посредством фагоцитоза, [796]), полагают, что слияние это произошло до эндосимбиоза с риккетсией, и что бактерия, участвовавшая в слиянии, не была риккетсией, [796,797]. Вопрос о том, какого рода слияние могло дать начало клетке эукариота, является основным в проблеме происхождения эукариотов.

Консервативность типа мембраны. Мембраны архей существенно отличаются от мембран бактерий. Принципиальные отличия обнаруживаются в стереохимии и структуре связей липидов мембраны. Кроме того мембраны архей не содержат пептидогликанов, для них характерны псевдопептидогликаны, отсутствующие у бактерий. Имеются и другие отличия. Автор работы [798] обратил внимание на тот факт, что и клеточные мембраны эукариотов и различные мембранные структуры внутри клеток (ядерная мембрана, аппарат Гольджи и др.) сходны с мембраной бактерий, но не архей. Однако структурно-химические особенности мембраны весьма консервативны, они мало изменяются в процессе эволюции. Несмотря на многочисленность примеров горизонтального переноса генов от бактерий к археям и на разнообразие описанных случаев эндосимбиоза, не было зафиксировано ни одного случая трансформации мембраны археи в мембрану бактериальную. Невозможность смены типа мембраны накладывает дополнительные ограничения на выбор возможного сценария возникновения эукариотов, [797,798].

Парадокс Кунина. Выше уже было упомянуто, что в геномах эукариотов выделяются три группы генов: гены, восходящие к археям, гены бактерий и гены, не обнаруживающие связей с геномами архей или бактерий. Если эукариоты являются потомками одной клетки, возникшей вследствие слияния клетки археи с клеткой бактерии, то и набор ассоциирующихся с археями генов эукариотов должен быть наследием одной клетки археи. Поэтому прямое сопоставление генов эукариотов с генами архей различных групп должно идентифицировать группу, представитель которой участвовал в слиянии. Такое

сопоставление стало возможно в последние годы вследствие значительного прогресса в исследовании геномов архей, [799].

Анализ молекулярных приспособлений, унаследованных эукариотами от архей, выполненный Евгением Куниным, [794], приводит к выводу о невозможности соотнесения их с какой-либо группой современных архей. Ни одна из современных архей не обладает и половиной генов, присутствовавших, согласно модели слияния геномов, в геноме археи, участвовавшей в слиянии. Модель слияния, тем самым, предполагает сосуществование в прошлом молекулярных устройств современных архей в некоем организме, ныне вымершем. Как если бы необычайно сложный и совершенный организм из домена архей «передал эстафету совершенства» новообразованной клетке эукариота, слившись с бактерией, и после этого сам деградировал в разных направлениях, утрачивая гены в различных сочетаниях, а «принявшие эстафету» потомки новоявленного эукариота, не утрачивая исходного генетического богатства, тем временем испытали взрывное развитие, в разных направлениях обогащая свой геном. Успешная модель происхождения эукариотов должна предложить более реалистическую схему наследования, не столь вычурную.

Система передачи сигналов. Если сосредоточиться на особенностях, присущих всем эукариотам, но отсутствующим у бактерий и архей, среди важнейших специалисты отмечают более высокий уровень организации клеточной структуры, компартментализацию (т.е. локализацию биохимических процессов в отдельных отсеках клетки) и систему обмена химическими сигналами между компартментами. Химические сигналы, регулирующие жизнедеятельность клетки эукариота, имеют направленный характер. Пассивная диффузия молекул, играющая важную роль в жизнедеятельности бактерий и архей, для эукариотов не имеет большого значения. Высоким уровнем совершенства системы передачи сигналов объясняется и тот факт, что клетки эукариотов в среднем в 1000 раз больше клеток бактерий и архей, [794].

Выгоды, доставляемые высокоорганизованной системой химической сигнализации, очевидны. Отсутствие такой системы у бактерий и архей показывает, что для возникновения её нужны специальные условия. Она могла возникнуть как отклик на специфические обстоятельства, в которых компартментализация и наличие системы обмена сигналами между компартментами становятся одним из факторов выживания. Реалистическая схема возникновения эукариотов обязана такие обстоятельства предъявить.

Наличие ядра. В клетке эукариота генный материал содержится в специальном компартменте, именуемом ядром клетки, отсутствующим у бактерий и архей. В ядре осуществляются репликация ДНК, транскрипция, а также сплайсинг (удаление интронов из пре-мРНК). От цитоплазмы клетки ядро отделено двойной мембраной, т.н. ядерной мембраной (*nuclear envelope*, NE). Обмен веществами между ядром и цитоплазмой регулируется системой специализированных транспортных каналов, именуемых ядерными порами (*nuclear pore*, NP), пронизывающих NE. Ядерные поры представляют собой многофункциональные, сложно устроенные, регулируемые структуры, их белковая составляющая, т.н. комплекс ядерной поры (*nuclear pore complex*, NPC), организована приблизительно 90 молекулами белков, именуемых нуклеопоринами. Филогенетический анализ белков, входящих в состав NE и NPC, выполненный авторами [800], показал наличие белков, происходящих от архей, белков, происходящих от бактерий, и белков эукариотического происхождения.

В течение длительного времени было принято считать, что трансляция никогда не осуществляется в ядре эукариотических клеток. Тем самым пространственное разделение транскрипции и трансляции, когда репликация, транскрипция, а также сплайсинг (удаление интронов из пре-мРНК) осуществляются только в ядре, а трансляция – только в

цитоплазме, полагалось некоей фундаментальной особенностью эукариотов, отличающих их от остальных живых существ. Предлагались и теории, объясняющие возникновение ядра необходимостью пространственного разделения транскрипции и трансляции, [799]. В литературе неоднократно появлялись сообщения о признаках трансляции в ядре, однако предъявленные свидетельства допускали двойное толкование, [801,802]. Наконец в 2012-2013 гг. были опубликованы результаты двух независимых исследований [803,804], предъявившие неопровержимые доказательства осуществления трансляции в ядре. За два года, прошедшие с момента публикации, каких-либо возражений опубликовано не было. По всей видимости, трансляция действительно может осуществляться в ядре, хотя и с небольшой интенсивностью. Ввиду вышеизложенного, возникновение ядра должно быть объяснено не целесообразностью пространственного разделения транскрипции и трансляции, а какими-то другими причинами.

Миграция генов из органелл в ядро. Явление эндосимбиоза, когда одна клетка живёт и функционирует внутри другой, имеет довольно широкое распространение в природе. Есть два примера необычных эндосимбионтов, глубоко интегрированных в структуру захвативших их клеток, в процессе эволюции превратившихся в клеточные органеллы – митохондрии и пластиды. Митохондрии (а также связанные с ними общностью происхождения гидрогеносомы и митосомы) ведут начало от паразитической бактерии, родственной риккетсиям. Первичные пластиды образовались в результате однократного симбиоза предка водоросли и цианобактерии. Кроме того различают комплексные пластиды (*complex plastids*), представляющие собой результат эндосимбиоза содержащего пластиду эукариота с клеткой ещё одного эукариота. В отличие от первичной пластиды, которая обычно окружена двойной липидной мембраной, комплексная пластида, образовавшаяся в результате вторичного или третичного эндосимбиоза, окружена тремя или четырьмя мембранами, [805]. У некоторых комплексных пластид сохраняется редуцированное ядро, т.н. нуклеоморф (*nucleomorph*), в редких случаях сохраняется и митохондрия, Рис 5-41.

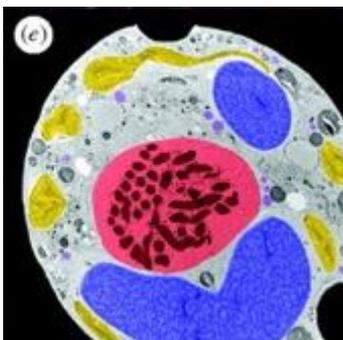


Рис 5-41. Эндосимбиоз в *Durinskia*, приведший к образованию пяти генетически различных компартментов: ядро хозяина (красный цвет), ядро эндосимбионта (синий), пластида эндосимбионта (желтый), митохондрии хозяина и эндосимбионта (фиолетовый). Из обзора [805]

Значительный интерес представляет судьба геномов эндосимбиотических организмов, давших начало митохондриям и пластидам. Геномы современных митохондрий и пластид (а также содержащихся в комплексных пластидах нуклеоморфов) в значительной степени редуцированы вследствие утраты генов и миграции генов в ядро. Утрата части генов часто сопутствует эндосимбиозу и паразитизму, но миграция генов в ядро, обнаруживаемая для митохондрий и пластид, составляет уникальную их особенность, важную для понимания ранних стадий развития эукариотов.

В качестве контрпримера, иллюстрирующего необычность явления, могут быть упомянуты хроматофоры раковинной амёбы *Paulinella chromatophora*. Эта амёба является фотосинтезирующей, в отличие от других представителей рода *Paulinella*, не обнаруживающих способности к фотосинтезу. В клетке *P. chromatophora* содержатся два хроматофора - образования в форме фасолины, зелёного цвета, представляющие собой

видоизменённые цианобактерии. Деление хроматофоров синхронизировано с делением хозяина. Детальные исследования показали, что хроматофоры являются эндосимбионтами, функциональными аналогами пластид, но генетически с пластидами не связаны. Хроматофор обладает собственным геномом, обнаруживающим несомненное сходство с геномом цианобактерий *Synechococcus/Prochlorococcus*, однако три четверти исходных генов эндосимбионта были утрачены. При этом в ядре *P. chromatophora* был обнаружен лишь один ген, возможно, мигрировавший туда из эндосимбионта, [805]. Факт миграции данного гена нельзя пока считать установленным, но, в любом случае, количество мигрировавших генов оказывается несопоставимым с количеством генов, утраченных в процессе образования эндосимбионта. Речь здесь в лучшем случае может идти о передаче в ядро отдельных генов, тогда как у митохондрий и пластид имела место передача в ядро нескольких тысяч генов.

Наибольшей редукции подверглись геномы предков митохондрий: митосомы и большинство гидрогеносом передали все свои сохранившиеся гены в ядро; в «классических» митохондриях содержится от 3 до 67 генов, кодирующих белки, от 0 до 27 генов, кодирующих тРНК, все митохондрии кодируют собственные рибосомы, [806]. Геномы пластид редуцированы чуть меньше. В них обнаруживается около 150 генов, среди которых всегда присутствуют гены, ответственные за транскрипцию и трансляцию, а также гены, кодирующие белки, [807]. При этом, в ядре *Arabidopsis thaliana*, например, согласно имеющимся оценкам, содержится 4500 генов, попавших туда из цианобактерии, давшей начало пластидам, [808].

Точный механизм миграции генов из митохондрий и пластид в ядро пока не установлен. Наиболее вероятной считается передача генов в виде т.н. комплементарной ДНК (сDNA), при которой подготовленная для трансляции мРНК гена подвергается обратной транскрипции с образованием двухцепочечной ДНК, а эта молекула перемещается в ядро и встраивается в хромосому, [809]. О причинах этого явления практически ничего не известно. С технической точки зрения наибольшие сложности представляет не однократный (в истории таксона) перенос гена из эндосимбионта в ядро, а транспорт тысяч синтезируемых молекул в соответствующую органеллу, регулярно воспроизводимый на протяжении каждого жизненного цикла. В ходе эволюции была создана сложнейшая система переноса молекул белков и тРНК через мембраны митохондрий, [810], а также во многом сходная с ней система переноса белков через мембраны пластид, [811,812]. Создание столь сложных механизмов, требующих к тому же значительных энергетических затрат для поддержания активности, вероятно, было оправдано особыми причинами. В эпоху возникновения и ранней эволюции эукариотов обработка наследственной информации эндосимбионтов в ядре создавала преимущества столь существенные, что все сопутствующие затраты оказывались оправданными. Теория происхождения эукариотов должна эти преимущества указать.

Интроны и интеины. Широкое распространение интронов составляет одну из отличительных особенностей эукариотических геномов: в них обнаруживаются аутокаталитические интроны группы I и группы II, т.н. сплайсосомные интроны и интроны в генах тРНК. Кроме того в них обнаруживаются сходные с интронами мобильные элементы, называемые интеинами. Интроны, рассекающие гены тРНК, эукариоты, вероятно, унаследованы от бактерий (или их предков), см. выше, раздел 5.5.2. Происхождение остальных составляет задку, разрешение которой составляет часть решения общей проблемы происхождения эукариотов.

Интеины. Интеинами называют мобильные генетические элементы, способные осуществить аутосплайсинг в процессе посттрансляционного созревания белковых молекул. Этим термином обозначается и кодирующий участок гена, и соответствующая ему аминокислотная последовательность. Интеин обычно состоит из 130-1600

аминокислот. После трансляции он самовырезается из белка-предшественника в результате пространственного белкового сплайсинга. Интеины кодируют самонаводящуюся эндонуклеазу (HEase, см. ниже), сообщающую им свойство мобильности. Это сближает интеины с интронами группы I. Подобно интронам, интеины демонстрируют спорадическое распределение в геномах, [813], однако какой-либо иной связи между интронами и интеинами не прослеживается, [814].

Первый интеин был обнаружен в 1990 г, [815], и с тех пор сотни их были найдены во всех доменах жизни – в геномах архей, бактерий и эукариотов, а также в геномах вирусов и фагов, [813,814]. Сопоставление данных о белках, чьи гены разбиваются интеинами, приводит к выводу о неслучайном распределении этих мобильных элементов в геномах. Интеины обнаруживаются в белках разных типов, но чаще всего они внедряются в гены белков, участвующих в метаболизме ДНК (такие как полимеразы, геликазы, топоизомеразы, рибонуклеотидредуктазы). Ещё одна, более общая, закономерность состоит в том, что интеины обнаруживаются в консервативных мотивах, критически важных для функционирования белка – каталитические центры ферментов, домены связывания лиганда с рецептором, [813]. Интересно отметить, что закономерности распределения интеинов в геномах сходны с закономерностями распределения интронов группы I в геномах фагов, см. выше, раздел 5.5.2. Эти интроны тоже, как правило, внедряются в высококонсервативные последовательности генов, участвующих в метаболизме ДНК.

Происхождение интеинов, их биологическое или потенциальное адаптивное значение остаются загадкой. В следующем разделе решение этих вопросов, а также связь интеинов с интронами увязываются с решением проблемы происхождения эукариотов.

Интроны группы I. Интроны этого типа обнаруживаются как в ядре, так и в органеллах. В ядерном геноме они присутствуют в генах большой и малой субъединиц рибосомной РНК. В геномах органелл (митохондрии и пластиды) интроны группы I присутствуют в генах рибосомной РНК, тРНК и в генах белков, [816]. Напомним, в геномах архей интроны группы I пока обнаружены не были. Интроны группы I, обнаруживаемые в хромосомах бактерий, не рассекают гены белков и, за редкими исключениями, не рассекают генов рибосомной РНК (см. выше, раздел 5.5.2). Тем самым, характер распределения интронов группы I в органеллах отличается от распределения их в бактериях, что примечательно, коль скоро митохондрии и пластиды произошли от бактерий.

Самонаводящиеся эндонуклеазы и их связь с интеинами и интронами.

Самонаводящиеся эндонуклеазы (*homing endonuclease*, HEase) – это класс ферментов, с высокой специфичностью распознающих и рассекающих молекулы ДНК. Активностью этих ферментов обеспечивается подвижность интеинов, многих интронов группы I и некоторых интронов группы II, [814]. Принципиальная схема процесса копирования интрона или интеина ферментом HEase из одного гена в другой показана на Рис 5-42.

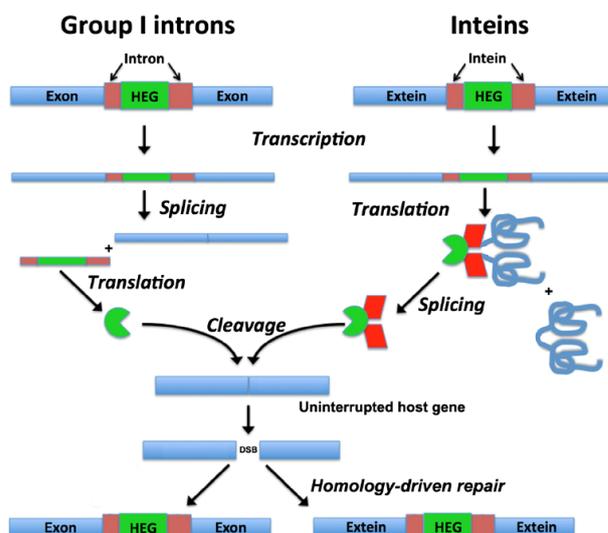


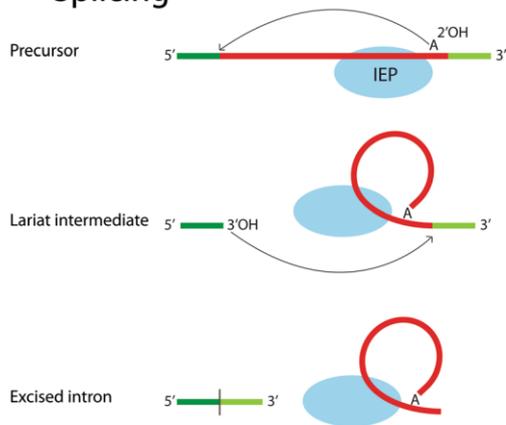
Рис 5-42. Обобщённая схема функционирования самонаводящейся эндонуклеазы (*homing endonuclease*). Двухцепочечные молекулы ДНК показаны как широкие голубые полосы, одноцепочечные молекулы РНК – как узкие прямые полоски, а аминокислотные последовательности изображены извилистыми голубыми линиями. Интеин и интрон показаны красным, ген самонаводящейся эндонуклеазы показан зелёным и обозначен HEG. **Слева**: после транскрипции нуклеотидная последовательность интрона удаляется из пре-мРНК сплайсингом, а ген самонаводящейся эндонуклеазы транслируется. Затем самонаводящаяся эндонуклеаза обнаруживает не содержащий интрона ген, гомологичный исходному, и совершает двусторонний надрез двухцепочечной ДНК в сайте, в который должен внедриться интрон. После этого хозяйская система репарации ДНК залечивает разрыв, используя гомологичный ген с интроном в качестве шаблона, тем самым перенося копию интрона в ещё один ген. **Справа**: Ген, содержащий интеин, транскрибируется и транслируется. Затем синтезированная полипептидная цепь испытывает белковый сплайсинг, высвобождая самонаводящуюся эндонуклеазу, которая обнаруживает ген, гомологичный исходному, но лишенный интеина, и совершает двусторонний надрез двухцепочечной ДНК. После этого хозяйская система репарации ДНК залечивает разрыв, используя гомологичный ген с интеином в качестве шаблона, тем самым перенося копию интеина в ещё один ген. *Из обзора [817].*

HEases были обнаружены во всех доменах жизни. У эукариотов гены, кодирующие эти ферменты, присутствуют в ядерном геноме и в геномах митохондрий и хлоропластов, [814]. Замысловатость механизма действия HEase и отсутствие эволюционных сценариев, способных объяснить происхождение этого класса белков, привлекли внимание широкого круга исследователей. В нескольких работах было показано, что филогенетические истории HEases и содержащих их интронов и интеинов не совпадают. Более того, сходные между собой интроны или интеины могут кодировать HEases разных типов. Были обнаружены и примеры противоположных взаимоотношений, когда сходные HEases кодируются филогенетически удалёнными интронами. На этом основании был сделан вывод об имевшем место внедрении генов HEases в ранее существовавшие интроны и интеины на определённой стадии эволюции, [818,819].

Выявлено несколько семейств HEases, отличающихся консервативными последовательностями. Примечательно, что группы ферментов, филогенетически не связанные между собой, обнаруживают разительное сходство каталитических стратегий: все молекулы HEases небольших размеров (<40 kDa), способны распознавать участки ДНК значительной длины (обычно от 14 до 40 пар нуклеотидов), производят двусторонний надрез ДНК в точно определённом месте. Механизм копирования интрона или интеина всегда использует хозяйскую систему репарации повреждённой ДНК, [819]. Остаётся неизвестным, какие факторы отбора могли способствовать выработке комбинации указанных необычных свойств у целой группы ферментов. Связь HEases с интронами и интеинами вкупе с широким распространением интронов и интеинов в геноме эукариотов наводит на мысль, что проблема происхождения этой группы ферментов составляет часть проблемы происхождения эукариотов.

Интроны группы II. Распределение интронов этой группы в эукариотических геномах обнаруживает ряд интересных закономерностей. В отличие от интронов группы I, обнаруживаемых в ядерном геноме и геномах органелл, интроны группы II присутствуют в геномах митохондрий и хлоропластов, но отсутствуют в ядре, [820]. Для большинства эукариотов интроны группы II редки, встречаются намного реже, чем интроны группы I. В некоторых геномах интроны группы II обнаруживаются в значительных количествах; в митохондриях наземных растений, например, этот тип интронов преобладает, [820,821]. Филогенетическими методами выявлено восемь типов интронов группы II. Примечательно, что лишь два из восьми типов встречаются в органеллах эукариотов. Предполагается, что интроны группы II попали в эукариотический геном вместе с генами бактерий. Выше указывалось, что бактериальные гены составляют значительную часть эукариотического генома, кроме того, митохондрии и хлоропласты представляют собой видоизменения бактерий. Вероятно, бактерии, принимавшие участие в возникновении эукариотов, содержали в своём геноме интроны группы II лишь двух типов.

A Splicing



B Mobility

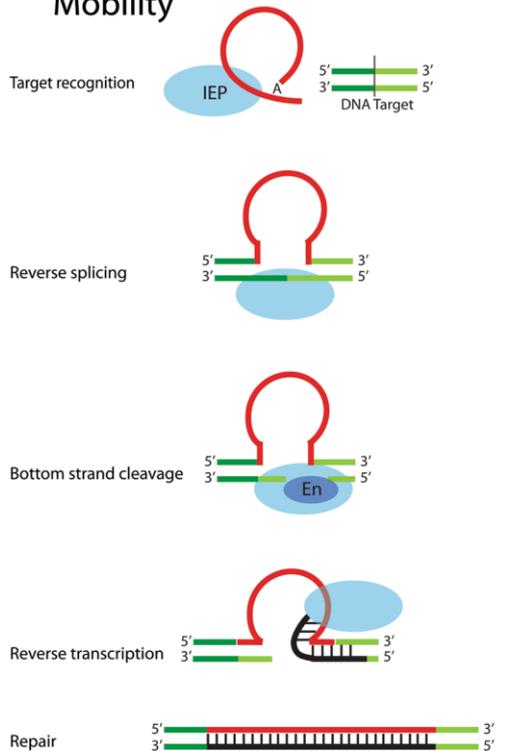


Рис 5-43. Реакции, катализируемые при участии интрона группы II. (А) Реакция сплайсинга. Сплайсинг является аутокаталитической реакцией. *In vitro*, при повышенной температуре и высокой концентрации Mg^{2+} , для осуществления сплайсинга достаточно собственной каталитической активности РНК. При физиологических условиях сплайсинг осуществляется при участии IEP. Молекула IEP связывается с интроном, способствуя принятию им конформации, подходящей для сплайсинга. Иссечённый интрон имеет конформацию лассо (*lariat*). После иссечения IEP сохраняет прочную связь с *лассо*, в результате образуется комплекс RNP, способный осуществить копирование интрона в гомологичный ген. (В) Реакция копирования интрона в гомологичный ген, т.н. *retrohoming*. Образовавшийся в результате сплайсинга RNP распознаёт участок внедрения на двухцепочечной ДНК и осуществляет обратный сплайсинг интрона в одну из цепочек. Затем один из доменов IEP, обладающий активностью ДНК-эндонуклеазы, совершает надрез второй цепочки, и содержащаяся в IEP обратная транскриптаза синтезирует цепочку ДНК, комплементарную интрону. После этого система репарации ДНК завершает кодирование.

Из обзора [820].

После транскрипции, сплайсинг многих интронов группы II может быть осуществлён *in vitro* при повышенной температуре и высоких концентрациях солей, в условиях, часто наблюдаемых в океане вблизи выходов геотерм. Однако *in vivo* сплайсинг обычно не может быть осуществлён без участия специализированных белков. Белки (т.н. матуразы), осуществляющие сплайсинг интронов группы II в митохондриях и хлоропластах, как правило, кодируются в ядерном геноме, [716]. Кроме того, матуразой, осуществляющей сплайсинг интрона группы II эукариотов, может служить белок, кодируемый ORF интрона. В некоторых случаях ORF интрона кодирует более сложные белки с целым набором активностей, благодаря которым соответствующий интрон приобретает свойства мобильной ДНК. Механизмы мобильности, посредством которых интрон группы II может быть скопирован из одного гена в другой (т.н. *retrohoming*, Рис 5-43), в настоящее время детально изучены, однако их происхождение остаётся загадкой.

Различные авторы по-разному обозначают белок, кодируемый ORF интрона группы II, сообщая ему свойство мобильности. Следуя авторам обзора [820], обозначим его как IEP (сокращённое *intron-encoded protein*). IEP транслируется после транскрипции, но прежде сплайсинга. После трансляции, IEP связывается двумя доменами со своим интроном в пре-мРНК, и в результате интрон приобретает конформацию, подходящую для сплайсинга, Рис 5-43 А. На этой стадии задействована способность IEP выступить в качестве матуразы. Высвобождаемый интрон имеет конфигурации петли, по этой причине его называют *lasso* (*lariat*). По завершении сплайсинга связь IEP с *lasso* сохраняется, и они образуют рибонуклеопротеин (RNP), который, собственно, и является молекулярной машиной, ответственной за придание интрону свойств мобильности.

Феномен мобильности интрона группы II состоит в возможности копирования интрона в ген, изначально интрона не содержащий, при помощи RNP. Для большинства интронов группы II реакция копирования высокоспецифична. Для её осуществления необходим определённый участок ДНК, состоящий из 20-35 пар нуклеотидов. Комплекс RNP обнаруживает и расплетает две цепи в месте встраивания интрона. (Один из доменов IEP способствует распознаванию нужного участка ДНК.) Затем имеет место обратный сплайсинг *lasso* в одну из цепей ДНК. От встречавшихся нам прежде примеров обратного сплайсинга данная реакция отличается тем, что имеет место встраивание рибозима в молекулу ДНК (а не РНК). Важно отметить, что каталитический механизм обратного сплайсинга аналогичен механизму, которым осуществляется сплайсинг: IEP способствует осуществлению реакции, приводя рибозим в ту же конформацию, в которой осуществляется сплайсинг. После встраивания интрона в одну из цепочек ДНК, комплементарная ей цепочка разрезается на некотором расстоянии от места разреза первой цепочки (со сдвигом на 9-10 пар нуклеотидов), и содержащаяся в IEP обратная транскриптаза синтезирует цепочку ДНК, комплементарную встроеному *lasso*, используя 3'ОН-конец разорванной цепи ДНК в качестве праймера. После этого система восстановления повреждённых ДНК клетки достраивает вторую цепочку ДНК, тем самым завершая копирование, [820].

Процесс копирования интрона группы II допускает несколько вариаций. Описанная выше последовательность шагов типична для IEP, в молекуле которого присутствуют все необходимые домены. В отсутствие некоторых доменов возможны упрощённые варианты, например, возможно встраивание интрона путём обратного сплайсинга в одноцепочечную ДНК в том месте, где двойная спираль ДНК расплетается для осуществления репликации или транскрипции, [716].

Несмотря на обширный объём экспериментальных данных, до сих пор не было предложено эволюционного сценария, объясняющего происхождение описанного механизма мобильности интронов группы II, причудливо комбинирующего каталитические активности рибозима и белка. Совместное рассмотрение вариаций вторичной структуры РНК интрона и филогенетической систематики соответствующих IEP показало, что интроны и кодируемые ими белки представляют собой результат

длительной совместной эволюции. Этим интроны группы II отличаются от интронов группы I, не обнаруживающих признаков совместной эволюционной истории с рекрутируемыми ими самонаводящимися эндонуклеазами, [820]. Обратная транскриптаза в IEP интронов группы II связана общностью происхождения с обратной транскриптазой одной из разновидностей ретротранспозонов – т.н. ретротранспозонами без длинных концевых повторов (non-LTR retrotransposons), имеющих широкое распространение в эукариотических геномах, [716]. Каталитический механизм сплайсинга интронов группы II обнаруживает сходство с механизмом удаления т.н. сплайсосомных интронов (см. ниже), составляющих уникальную особенность генома эукариотов. Последние два обстоятельства наводят на мысль, что проблема происхождения механизмов копирования интронов группы II составляет часть проблемы происхождения эукариотов.

Сплайсосомные интроны. Интроны этого типа были обнаружены практически во всех исследованных ядерных геномах эукариотов и только в них. Для разных организмов количество сплайсосомных интронов может меняться на несколько порядков, [822].

Интроны подразделяются на группы исходя из данных об их вторичной структуре и о механизме сплайсинга. Сплайсинг интронов, обнаруживаемых в тРНК архей и эукариотов осуществляется специализированными ферментами. Эти интроны не имеют собственной каталитической активности. Сплайсинг интронов группы I и группы II осуществляется за счёт собственной каталитической активности иссекаемой РНК. Механизм сплайсинга сплайсосомных интронов уникален – осуществляется рибозимом, тогда как сама иссекаемая РНК каталитической активностью не обладает. Молекулы пре-мРНК, содержащие интроны этого типа, подвергаются сплайсингу при помощи сложного рибонуклеопротеинового комплекса, именуемого сплайсосомой, образуемого пятью молекулами малой ядерной РНК (snRNA) и более чем 200 белками, [820,822]. Сплайсосомные интроны имеют короткие концевые последовательности, распознаваемые сплайсосомой, кроме того вблизи 3'-конца интрона имеется короткая фиксированная последовательность, именуемая точкой ветвления, используемая при сплайсинге. Остальные нуклеотиды интрона, число которых может достигнуть миллиона, не были фиксированы в процессе эволюции и потому произвольны, [822].

По мере изучения механизма сплайсинга, среди специалистов возобладало мнение о происхождении сплайсосомных интронов от интронов группы II. Задействованные каталитические механизмы идентичны, и иссекаемый интрон в обоих случаях имеет конформацию *лассо*. Исследования влияния замещений на кинетику сплайсинга указывает на сходство строения активных центров рибозимов. Имеются очевидные параллели между мотивами структуры интронов группы II и молекул snRNAs сплайсосомы. Вблизи активного центра сплайсосомы был даже обнаружен домен обратной транскриптазы, гомологичный обратной транскриптазе интронов группы II. Граничные последовательности интронов обоих типов тоже обнаруживают высокую степень сходства, [820].

Перечисленные результаты практически не оставляют сомнений, что сплайсосома связана общностью происхождения с интронами группы II. Однако родство интронов группы II со сплайсосомными интронами отсюда никак не следует. Интроны группы II могли быть рекрутированы для сплайсинга сплайсосомных интронов. Сходство концевых последовательностей сплайсосомных интронов с аналогичными последовательностями на концах интронов группы II тоже может быть следствием рекрутирования интронов группы II, поскольку в обоих случаях эти последовательности служат сигнальными для сплайсинга. Концевые последовательности сплайсосомных интронов могли быть изменены в процессе эволюции для обеспечения правильной работы сплайсосомы, составные элементы которой были заимствованы у интронов группы II. В итоге концевые последовательности должны быть похожи или идентичны, но из этого ещё не следует, что интроны, давшие начало сплайсосомным, были идентичны интронам группы II.

Выше упоминалось высказанное рядом авторов предположение, что интроны группы II присутствовали в геноме бактерии, принимавшей участие в создании первой эукариотической клетки, [823]. Можно также предположить, что бактерии, в результате длительной совместной эволюции, выработали какую-то систему защиты от интронов. Археи, вероятно, такой защиты не имели. Поэтому после образования первой клетки эукариота, осуществившемся при участии клетки бактерии и клетки археи, интроны группы II беспрепятственно размножились. В результате общее их количество в геноме новообразованного эукариота достигло беспрецедентной величины. В ходе последующих эволюционных изменений интроны группы II могли постепенно превратиться в сплайсосомные интроны. Данная гипотеза происхождения сплайсосомных интронов была высказана автором [824].

При всей привлекательности гипотезы об интронах группы II, беспрепятственно размножившихся, заполонивших геном новообразованного эукариота и впоследствии превратившихся в сплайсосомные интроны, она не согласуется с данными о интронах архей. Вскоре после того, как данная гипотеза была сформулирована в работе [824], интроны группы II были обнаружены в двух родственных видах архей, [824,699]. Филогенетический анализ гена обратной транскриптазы, кодируемой в ORF интрона, показал, что интроны были заимствованы у бактерий, [699]. Однако общее число обнаруженных интронов группы II оказалось незначительным (4 и 21, соответственно). Тем самым беспрепятственное распространение интронов в геноме не имело места в геноме исследованных архей, в очевидном противоречии гипотезой авторов [824].

Вопрос о том, интроны каких типов могли впоследствии превратиться в сплайсосомные интроны, сам по себе, не столь важен. Для прояснения проблемы происхождения эукариотов важно указать причины, вследствие которых сплайсосомные интроны размножились в ядерном геноме в беспрецедентных масштабах, и понять, почему они отсутствуют в геномах органелл. Кроме того, механизм сплайсинга, в котором используется каталитическая активность сплайсосомы, унаследованная от интронов группы II, наводит на мысль об отсутствии собственной каталитической активности у интронов, ставших впоследствии сплайсосомными интронами (или у их части). Поэтому представляется важным указать причину утраты каталитических свойств данными интронами в процессе возникновения эукариотов.

Половое размножение. В отличие от бактерий, которые в норме имеют гаплоидный набор хромосом, и архей, тяготеющих к полиплоидии, [826], соматические клетки эукариотов имеют диплоидный набор хромосом. Считается, что это одна из особенностей присущего им (и только им) полового способа размножения, в котором слияние двух гаплоидных половых клеток, или гамет, приводит к образованию диплоидной клетки зиготы. После слияния гамет имеет место специализированный процесс двукратного деления, называемый мейозом, в результате которого диплоидные клетки дают начало гаплоидным гаметам. Одно из событий, имеющих место при протекании мейоза, заключается в рекомбинации генов – разрывах и соединениях молекул ДНК, приводящих к обмену генетического материала родителей. Особенности полового процесса могут варьировать у разных групп эукариотов, однако исследование стадий мейоза показало разительное их сходство, на молекулярном уровне, для самых разных таксонов, [827]. Наличие мейоза у всех эукариотов, его консервативный характер, а также консервативный характер многих участвующих в мейозе белков не оставляет сомнения в наличии мейоза и рекомбинации генов у общего предка эукариотов, [827-829].

Мейоз – это особенность популяции, а не индивида. Повсеместное распространение мейоза у эукариотов свидетельствует о существенных преимуществах, доставляемых половым способом размножения. Однако до сих пор остаётся неясным, в чём они заключаются. Существуют теоретические построения, согласно которым половой

процесс способствует приобретению и распространению полезных признаков, способствующих адаптации, [830]. Широкое распространение получила т.н. детерминированная гипотеза мутаций, согласно которой преимущества полового размножения состоят в возможности избавиться от умеренно вредной мутации путём получения здоровой копии того же гена от другого родителя, [831]. Трудности идентификации преимуществ полового способа размножения связаны с невозможностью проверки теоретических предсказаний экспериментальным путём. В чём бы ни заключались эти преимущества, они, по всей видимости, могут проявиться только на уровне группы и не несут прямой выгоды для индивида.

Молекулярные механизмы мейоза и рекомбинации генов хорошо изучены для нескольких модельных организмов. В них нет каких-либо технических деталей, недоступных бактериям. Однако бактерии размножаются простым делением. Отсутствие полового размножения у бактерий может быть объяснено тем, что в их среде никогда не возникало значительной популяции индивидов, прибегающих к данному способу размножения, достаточной для проявления преимуществ полового размножения над простым делением. Из сказанного ясно, что на определённом этапе становления эукариотов половое размножение должно было приносить непосредственную выгоду индивидам. Теория происхождения эукариотов должна предъявить фактор, вследствие которого способность к мейозу и рекомбинации генов стала одним из условий выживания предков эукариотов (причём этот фактор не имеет силы для предков бактерий и архей). В силу сделанного выше вывода о существовании мейоза у общего предка эукариотов, искомым фактор должен был проявиться на ранней стадии становления эукариотов. Фактор этот может не иметь силы и для современных эукариотов. К моменту, когда он утратил своё значение, возникла достаточно крупная популяция организмов, размножающихся половым путём, и (остающиеся неизвестными) преимущества этого способа размножения воплотились.

Мейотический кроссинговер. Возможность одновременного наследования признаков от матери и от отца при половом размножении обеспечивается в процессе, называемом гомологической рекомбинацией, осуществляемом в начале длительной и замысловатой профазы I мейоза (см, например, главы 5 и 17 пособия [832]). Репликация ДНК происходит до начала профазы I, поэтому на интересующей нас стадии каждая из двух гомологичных хромосом представлена парой идентичных сестринских хроматид. В начале профазы I гомологичные хромосомы попарно связываются друг с другом посредством специального комплекса, образуя т.н. бивалент, Рис 5-44 (А). Одна пара сестринских хроматид бивалента происходит от отца, и одна от матери.

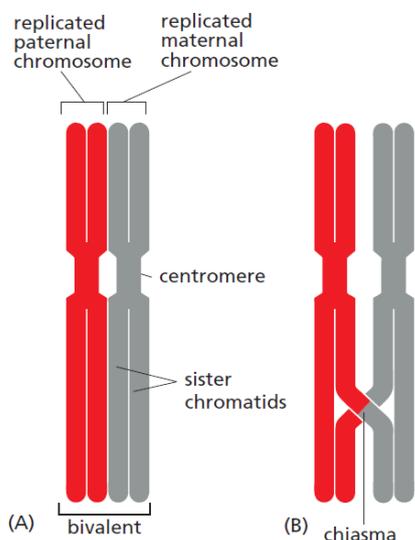


Рис 5-44 . Конъюгация гомологичных хромосом в мейозе. (А) Структура, образуемая при тесном соединении двух гомологичных пар сестринских хроматид, называемая бивалентом. Хроматиды, происходящие от отца, показаны красным, а от матери – серым. (В) Возникновение единичного кроссинговера в биваленте и образование хиазмы путем соединения несестринских хроматид.

Гомологическая рекомбинация инициируется при образовании двухцепочечных разрывов в молекуле ДНК, осуществляемых эндонуклеазой *spo11*, [833]. Надрезы располагаются на молекуле ДНК закономерным образом, точнее, они располагаются случайным образом в небольших отрезках ДНК, длиной 50-200 пар нуклеотидов. Правильное функционирование *Spo11* требует участия не менее десяти других белков, [829]. Гомологи эндонуклеазы *Spo11* имеются у всех эукариотов, что говорит о наличии его у общего предка эукариотов. Этот белок обнаруживает гомологию с субъединицей А топоизомеразы Торо VI архей, [833].

После надрезания двойная спираль ДНК расплетается в области разрыва, и одна из цепочек используется для формирования выступающего 3'-ОН конца. Этот одноцепочечный конец затем вторгается в участок ДНК на гомологичной хромосоме со сходной последовательностью нуклеотидов, где имеет место реакция обмена цепей, в результате которой образуется гетеродуплекс, состоящий наполовину из материнской и наполовину из отцовской цепей. Возникающая при этом структура именуется хиазмой, Рис 5-44 (В). Опуская технические детали (изложенные, например, в обзорных статьях [829,834]), внедрение цепочки ДНК и образование гетеродуплекса регулируется комплексом белков, в котором центральную роль играет белок *Rad51*. Данный белок является гомологом белков *RecA* и *RadA*, соответственно, бактерий и архей. Примечательно, что функции этих белков у бактерий и архей сходны с функциями гомологичного им *Rad51* эукариотов. Однако *RecA* и *RadA* задействованы в репарации двухцепочечных разрывов ДНК, и, в отличие от *Rad51*, катализируемые ими реакции никак с размножением не связаны, [835,836].

Механизм завершения рекомбинации у эукариотов ещё не был детально изучен, однако, из общих соображений, для этого необходимо совершить два одноцепочечных надреза и лигировать образовавшиеся концы. Сделать это можно двумя альтернативными способами. Один способ надрезания цепочек приводит к кроссинговеру и образованию рекомбинантной хромосомы, содержащей гены отца и матери. При альтернативном надрезании кроссинговер не имеет места, и обмен между генами происходит только по участку незначительной длины, [829]. Если бы надрезание производилось случайным образом, то кроссинговерные и некроссинговерные надрезы возникали бы с равной частотой. Важно отметить, что в действительности этого не происходит. Частотность мейотического кроссинговера тщательно регулируется. В среднем имеет место один или два кроссинговера на каждую пару гомологичных хромосом (но не меньше одного), причём общее количество кроссинговеров на мейоз ограничено, с тем чтобы хиазмы не располагались близко одна от другой, [837,838]. Установлено, что частота возникновения кроссинговера в мейозе регулируется белками *Msh4* и *Msh5*, [839]. Эти белки являются гомологами бактериального белка *MutS*. Однако функции *MutS* у бактерий с гомологической рекомбинацией не связаны: он используется при устранении нарушений принципа комплементарности в двухцепочечных молекулах ДНК, [840].

В результате кроссинговера происходит обмен участками равной длины между отцовской и материнской хромосомами. Поскольку в обмен вовлечены только две цепи ДНК из четырёх, на обмениваемых участках, в случае отличия отцовских генов от материнских, могут возникнуть локальные нарушения двойной спирали. Эти нарушения распознаются и устраняются специальными ферментными системами, работающими по типу эксцизионной репарации, [841].

Изложенные здесь особенности мейотического кроссинговера понадобятся нам в следующем подразделе, где предложена схема возникновения эукариотов. Центральное место в предлагаемой там схеме отведено эксцизионной репарации локальных нарушений двойной спирали на завершающей стадии кроссинговера.

Сходство мейоза с трансформацией. В домене бактерий широкое распространение имеет явление горизонтального переноса генов. В одной из форм такого переноса,

именуемой *генетической трансформацией*, бактерия-реципиент забирает молекулу хромосомной ДНК у другой бактерии того же или родственного вида и вставляет часть её в собственный геном. Бактерия-донор при этом погибает. Это единственный процесс горизонтального переноса генов, в котором хромосомная ДНК непосредственно переносится из одной бактерии в другую. Среди известных форм горизонтального переноса генов трансформация является наименее распространённой, наблюдалась у примерно 70 видов бактерий, [842,843]. Исследование механизма, посредством которого захваченная ДНК вставляется в геном бактерии-реципиента, приводит к выводу, что биологическое значение трансформации состоит в репарации двухцепочечных разрывов ДНК клетки-реципиента, [844]. По ряду признаков генетическая трансформация бактерий оказывается сходной с мейозом, и это наводит на мысль, что мейоз мог возникнуть как некоторого рода вариация трансформации, [845]. Однако при ближайшем рассмотрении обнаруживаются и принципиальные отличия.

Трансформация – это сложный, многоступенчатый процесс, требующий экспрессии большого числа генов (около сотни). Не все особенности этого процесса понятны. Прежде чем осуществить трансформацию, клетки должны перейти в особенное состояние, называемое *компетентностью*. Каскад превращений, в результате которого клетка становится компетентной, запускается при достаточно высокой концентрации выделяемого клетками пептида CSP (*competence-stimulating peptide*), часто называемого феромоном. По мере накопления CSP в среде, он стимулирует специализированный клеточный рецептор на поверхности клеточной мембраны и после ряда превращений в окружающую среду выделяется протеолитический фермент лизоцим, разрушающий пептидогликаны мембраны находящейся вблизи некомпетентной клетки. Затем специализированные белки извлекают ДНК из убиваемой клетки-донора и быстро доставляют её внутрь клетки-реципиента, [842,843]. При этом компетентная клетка вырабатывает белки ComM и CibC, благодаря которым сама она остаётся иммунной к действию лизоцима, [843].

Важно отметить, что клетка-донор обладает способностью экспрессировать собственные белки ComM и CibC и тем самым стать неуязвимой для атаки. Очевидно, в процессе эволюции не было выработано подобных механизмов защиты. Описаны даже случаи, когда некомпетентная бактерия реагирует на атаку выделением собственного лизоцима, ускоряющего её разрушение. Кроме того, ДНК при трансформации извлекается только из целенаправленно убиваемой клетки. Не было обнаружено факторов, позволяющих бактериям извлекать из среды свободно «плавающую» ДНК, [843]. Тем самым, трансформация, вероятно, является примером партнёрских взаимоотношений двух клеток, и биологическое значение этого партнёрства ещё предстоит выяснить. Нет ясности и в вопросе о том, когда и при каких условиях передача генов осуществляется *in vivo*, [843].

В лабораторных условиях было обнаружено большое число факторов, способствующих компетентности бактерий, биологическое значение которых остаётся неясным, такие например, как слабощелочная рН среды, [843]. Стимуляторами трансформации могут быть факторы стресса, такие как голодание, высокая плотность популяции, высокая частота непосредственных контактов между бактериями. Кроме того, компетентность стимулируется под действием факторов, нарушающих целостность ДНК, таких как действие антибиотиков, вызывающих двухцепочечные разрывы ДНК, или ионизирующих излучений, [843-845]. Последнее обстоятельство позволило некоторым авторам предположить, что биологическое предназначение трансформации состоит в репарации двухцепочечных разрывов в молекуле ДНК. Серьёзным аргументом в поддержку этого предположения служит тот факт, что ДНК, извлекаемая из некомпетентной клетки-донора, используется клеткой-реципиентом для гомологической рекомбинации собственной ДНК. Центральную роль в осуществлении рекомбинации при трансформации играет белок RecA, используемый также для устранения двухцепочечных разрывов,

случайно возникающих при других внутриклеточных процессах, например при обламывании репликационной вилки, [846]. Однако, при всём правдоподобии, предположение о репарации двухцепочечных разрывов ДНК как о цели трансформации не объясняет партнёрского характера взаимоотношений двух клеток в этом явлении.

Процессы мейоза у эукариотов и трансформации у бактерий обнаруживают сходство, проявляющееся в нескольких аспектах. Подобно бактериям, одноклеточные эукариоты часто обращаются к сексу и мейозу при наличии таких факторов стресса, как голодание и высокая плотность популяции. Бактериальный белок RecA, осуществляющий рекомбинацию ДНК при трансформации, является гомологом упоминавшегося выше белка RadA, играющего центральную роль в гомологичной рекомбинации при мейозе. Кроме того, мутации в генах гомологичной рекомбинации у эукариотов повышают чувствительность клеток к ионизирующему излучению (см. ниже), а ионизирующие излучения входят в число факторов, стимулирующих компетентность у бактерий. На этом основании авторы [845] выдвинули гипотезу о происхождении эукариотов путём постепенного эволюционного изменения бактерий, в ходе которого трансформация превратилась в мейоз. Биологическое значения трансформации и мейоза авторы гипотезы видят в необходимости репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Гипотеза представляет несомненный интерес, хотя она, конечно, не объясняет (обсуждавшегося выше) главного противоречия – факта наличия у эукариотов большого числа генов бактерий и архей в отсутствие промежуточных форм, будь то между бактериями и археями, бактериями и эукариотами, археями и эукариотами.

К перечню сходных черт трансформации и мейоза можно добавить ещё одну – концептуальную. Оба феномена одинаково необъяснимы. В обоих случаях имеет место партнёрство двух организмов, выгоды которого не очевидны, в случае мейоза для обоих участников, а в случае трансформации – для одного (убиваемой бактерии). Поэтому предположение о «произрастании» мейоза из трансформации само по себе мало что может прояснить.

Помимо сходства между мейозом и трансформацией, имеются и отличия, принципиального характера. Первое состоит в необходимости общей (по всей длине молекулы) гомологии между рекомбинирующими молекулами ДНК в мейозе, тогда как при трансформации гомология имеет место лишь локально, в области разрыва (размер вставляемого участка не превосходит обычно нескольких тысяч пар нуклеотидов, [847]). Второе, более важное, отличие состоит в том, что при трансформации репарация может иметь место только для случайно возникших двухцепочечных разрывов молекул ДНК, тогда как при мейозе эти разрывы создаются целенаправленно, запланированным образом (при участии упоминавшейся выше эндонуклеазы Spo11).

Очевидно, перечисленные выше факты сходства трансформации и мейоза, а также различия между ними входят в число явлений, которые модель происхождения эукариотов должна объяснить.

Связь мейотических генов с устойчивостью клетки к ионизирующим излучениям. В экспериментах с дрожжевыми грибами во второй половине прошлого века были выявлены гены, мутации в которых приводили к повышенной уязвимости клеток к действию УФ и рентгеновского излучения. По этой причине их обозначают как *rad*-гены (radiation-repair genes). Впоследствии было обнаружено, что мутации у части этих генов приводят также к нарушениям гомологичной рекомбинации в мейозе, [829,848,849,]. Данное обстоятельство, вкуче с упоминавшимся выше чертами сходства мейоза и трансформации, наводят на мысль, что и трансформация, и мейоз могли возникнуть как адаптации к аномально высоким уровням радиации в среде обитания.

Слияния клеток и рекомбинация у *Haloflex*. Черты сходства трансформации у бактерий и мейоза, составляющего часть полового процесса у эукариотов, вероятно,

указывают на участие бактерий (или бактерии) в том процессе, который привёл к возникновению эукариотов. Данное предположение согласуется с упоминавшимися ранее филогенетическими данными, указывающими на наличие у эукариотов большого числа генов отчётливо бактериального происхождения. В то же время у эукариотов обнаружено и большое число генов, происходящих от архей, указывающих, что археи тоже внесли свой вклад в создание эукариотов. В этой связи представляется знаменательным, что и у архей описан процесс межклеточного взаимодействия, отдалённо напоминающий половой процесс, подобно бактериальной трансформации сопровождающийся рекомбинацией хромосомной ДНК и никак с размножением не связанный.

Обсуждаемый процесс до настоящего времени изучен только для галофильной археи *Haloferax volcanii*, обитающей в водах Мёртвого моря. Приводимые здесь сведения заимствованы из обзорной статьи [850]. Слиянию двух клеток предшествует некий процесс распознавания, в течение которого клетки приходят в физический контакт. Затем между клетками образуются перешейки (bridges), различимые в электронный микроскоп. После этого клетки сливаются с образованием одной клетки, содержащей два полных набора хромосом, а также все содержавшиеся в участницах плазмиды. По завершении слияния клетки вновь расходятся, при этом каждая восстанавливает собственный набор хромосом, но может иметь место «перетасовка» плазмид.

В описанном слиянии участвует лишь 0.02% популяции, а после расхождения у 62% (участвовавших в слиянии) клеток обнаруживаются рекомбинантные гены. В отличие от трансформации бактерий, сопровождающейся лишь обменом небольших фрагментов генома, рекомбинация в описываемом слиянии архей затрагивает сотни тысяч пар нуклеотидов. В среднем около 17% генома оказываются переставленными, что приближается к значениям 50:50, типичным для гомологичной рекомбинации при мейозе эукариотов.

Ещё одно отличие обсуждаемой рекомбинации архей от бактериальной трансформации состоит в том, что некоторая удалённость видов не составляет непреодолимого препятствия при скрещивании. Показана возможность слияния клеток и рекомбинации генов двух родственных видов *Haloferax*, кодирующие последовательности которых отличаются на 14%.

Остаётся неясным, является ли описанное слияние клеток явлением, типичным для архей. Изученность его у *Haloferax volcanii* связана, главным образом, с тем, что этот вид экстремофилов легко размножается в лабораторных условиях. Возможно, данный процесс межклеточного взаимодействия, сопровождающийся рекомбинацией генов, возник как адаптация к условиям, имевшим место 3.5 – 4 млрд. лет назад, ныне утратившим актуальность. В этой связи сходство слияния архей с половым взаимодействием одноклеточных эукариотов, возникших примерно тогда же, представляется знаменательным.

Ацидокальциосомы. Выше (раздел 5.9.4), при обсуждении ацидокальциосом, было высказано предположение о рудиментарной природе этих богатых полифосфатом органелл. Вероятно, ранее они содержали кристаллический апатит, использовавшийся в качестве основы при синтезе полинуклеотидов. В этих предположениях, широкое распространение ацидокальциосом у эукариотов указывает на использование стемпинга для передачи наследственной информации предками эукариотов.

Двухцепочечная ДНК. В предшествующих разделах настоящей главы высказывалось предположение о происхождении архей от организмов, реплицировавших РНК, тогда как предки бактерий предстают «создателями» одноцепочечной ДНК, чей жизненный цикл основывался на чередовании транскрипции и обратной транскрипции. Поскольку доменов жизни всего три, возникает искушение связать с эукариотами (или их предками)

возникновение двухцепочечной ДНК и жизненного цикла, основанного на комбинировании репликации ДНК и транскрипции.

Регуляторная РНК. В жизнедеятельности подавляющего числа эукариотов большое значение имеют высокоспецифичные механизмы регуляции экспрессии генов, в которых для отождествления регулируемого гена используются небольшие (19-31 нуклеотидов) фрагменты молекул РНК. Фрагмент одноцепочечной РНК, называемый «направляющей» (guide strand), используется для идентификации регулируемого гена путём образования уотсон-криковских пар с комплементарным ей участком субстрата – определённым участком хромосомной ДНК или мРНК. Механизмы этого типа могут быть задействованы как для подавления экспрессии гена (и в таком случае говорят об РНК-интерференции, RNAi), так и для интенсификации экспрессии (и это явление именуется РНК-активацией, RNAa). В целом феномен RNAi изучен более детально и, вероятно, имеет более широкое распространение, нежели RNAa.

Для подавления экспрессии гена при RNAi, «направляющая» РНК входит в состав РНК-белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), основу которого составляет белок из группы Argonaute. Активности комплекса RISC затем используются для подавления экспрессии гена, причём это может быть осуществлено различными способами, как на уровне транскрипции, так и трансляции. Для прерывания трансляции содержащийся в RISC одноцепочечный фрагмент РНК может соединиться с комплементарной ему последовательностью молекулы мРНК, после чего следует разрезание мРНК за счёт собственной эндонуклеазной активности белка Argonaute. Комплекс RISC может также присоединить дополнительные белки, способные воздействовать на трансляцию, вызывая деаденилирование мРНК. Другие факторы, входя в состав RISC, сообщают ему способность метилировать ДНК или изменять структуру хроматина, тем самым препятствуя транскрипции регулируемого гена, [861-866].

Механизмы РНК-интерференции играют важную роль в регуляции экспрессии генов организмов, а также в защите от вирусов и подавлении активности транспозонов. О важности и масштабах феномена RNAi можно судить, например, по тому факту, что у млекопитающих в нём задействованы десятки тысяч различных молекул РНК, [862].

Механизмы RNAi сложны и многообразны, но они всегда осуществляются при участии белка Argonaute. На основании данных филогенетического анализа белки этого семейства подразделяются на две кланды: Ago и Piwi, [867]. Аминокислотные последовательности белков входящих в Ago ближе к таковой белка Argonaute-1 растения *Arabidopsis*, а последовательности входящих в Piwi ближе к таковой одноимённого белка мухи *Drosophila*. Белки Ago экспрессируются на всех стадиях жизненного цикла клетки, для них характерна ассоциация с белком Dicer и РНК-зависимой РНК полимеразой (RdRP). Белки Piwi главным образом вовлечены в сайленсинг (подавление активности) транспозонов и в регулирование экспрессии генов, филогенетически связанных с транспозазами. В отличие от Ago, белки Piwi (у многоклеточных) экспрессируются, главным образом, в гонадиях, и для них не характерна ассоциация с Dicer и RdRP, [868] (однако ассоциация Piwi и Dicer имеет место у инфузорий).

Примечательная особенность белков кланды Ago в том, что для образования комплекса RISC им требуется фрагмент двухцепочечной РНК. Известны два пути образования таких молекул: в одном одноцепочечная РНК, образуемая транскрипцией ДНК, складывается вдвое с образованием структуры петля-стебель. Затем белки Drosha и Dicer вырезают двухцепочечный фрагмент из участка стебля структуры. При другом пути комплекс RISC образуется при участии РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRP). Сначала одноцепочечный транскрипт длиной в десятки или сотни тысяч нуклеотидов копируется полимеразой RdRP с образованием двухцепочечной молекулы РНК, затем Dicer нарезает полученную молекулу на фрагменты РНК требуемой длины. Далее, фрагменты двухцепочечной РНК, полученные тем или иным способом, приходят во взаимодействие с

Ago, но, сколь это ни парадоксально, только одна из цепочек, называемая «направляющей» входит в состав комплекса RISC, а цепочка комплементарная «направляющей» разрушается, [861,866].

Очевидно, затрат на синтез и последующее разрушение одной из цепочек РНК можно было бы избежать, снарядив Ago «направляющей» напрямую, минуя двухцепочечную стадию. Причём задача подобного «спрямления» пути синтеза RISC вполне решается – именно так взаимодействуют с РНК (гомологичные Ago) белки Piwi многих многоклеточных эукариотов (планарии, морские ежи, млекопитающие). Эти белки, минуя и Dicer и RdRP, непосредственно взаимодействуют с одноцепочечной РНК, образуемой при транскрипции определённых участков ДНК, [865,867]. Разумно предположить, что ассоциация Ago с Dicer унаследована от древнего механизма RNAi, в котором каким-то образом использовался двухцепочечный характер задействованных молекул РНК.

Феномен RNAi имеет повсеместное распространение среди эукариотов. Сличением геномов показано, что основанные на RNAi механизмы регуляция экспрессии генов должны были иметь место в клетке их общего предка. Этот организм содержал основные белки, вовлечённые в RNAi: Ago, Piwi, Dicer и RdRP, [869]. Механизмы подавления экспрессии генов, подобные RNAi, обнаружены у некоторых бактерий и эукариотов. У бактерий *Thermus thermophilus* и *Rhodobacter sphaeroides* обнаружен белок Argonaute, который в качестве «направляющей» использует фрагмент ДНК (а не РНК). Этот белок затем обнаруживает и рассекает комплементарный участок молекулы ДНК, [870,872]. Аналогичное явление описано для археи *Methanocaldococcus jannaschii*, [871]. Гены, гомологичные Argonaute, обнаружены в 32% и 9% секвенированных геномов, соответственно, архей и бактерий. Однако филогенетическими методами было показано, что этот белок был ими приобретён у эукариотов посредством горизонтального переноса генов, [873]. Тем самым загадка возникновения механизмов RNAi составляет часть общей проблемы происхождения эукариотов. Детальные исследования механизмов RNAi приводят к выводу, что, скорее всего, они возникли как средство для подавления активности транспозонов.

Транспозоны – это участки ДНК организмов, способные к перемещению (транспозиции) и размножению в пределах генома. Перемещения имеют место в пределах одного генома, не покидая клетки, и этим транспозоны отличаются от вирусов и фагов, передающихся от одной клетки к другой. На основании структуры и механизма транспозиции транспозоны подразделяют на две обширные группы: ретротранспозоны и ДНК-транспозоны. Жизненный цикл ретротранспозонов основан на чередовании транскрипции и обратной транскрипции. Транспозоны этой группы кодируют фермент обратную транскриптазу, катализирующую синтез двухцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК. ДНК-транспозоны отличаются от ретротранспозонов тем, что механизмы транспозиции не включают в себя синтез РНК. Транспозоны этого класса кодируют фермент транспозазу, при помощи которой транспозон может быть вырезан из одного сайта геномной ДНК и встроен в другие сайты. Ранее было принято считать, что перемещение ДНК-транспозонов в геноме всегда осуществляется по схеме «вырезать и вставить» (*cut and paste*), и в этом видели их отличие от ретротранспозонов, перемещения которых осуществляются по схеме «копировать и вставить» (*copy and paste*). Впоследствии были обнаружены и ДНК-транспозоны, механизм перемещения которых включает в себя копирование (репликацию ДНК), [873,874].

Транспозоны обнаружены во всех доменах жизни, но наибольшее распространение они получили у эукариотов. Большинство эукариотических геномов содержат транспозоны, тогда как в 20% секвенированных геномов прокариотов признаков транспозонов не обнаруживается. Кроме того, общее количество транспозонов в отдельном геноме достигает больших значений у эукариотов (до 80% генома), нежели у прокариотов (до 10%, в среднем 1-5%), [875]. Во всех трёх доменах жизни транспозоны обнаруживают

крайне неравномерное распределение по таксонам, [876], в этом отношении они сходны с интронами.

О происхождении транспозонов практически ничего не известно. Данные филогенетического анализа свидетельствуют о необычайной древности кодируемых ими белков. По крайней мере, для ДНК-транспозонов можно утверждать, что геном общего предка всех эукариотов уже содержал представителей разных групп этих мобильных форм ДНК, [876]. Большинство исследователей считают транспозоны представителями паразитических форм ДНК, эволюция которых не имеет иных целей кроме приумножения числа копий себя самих, [877,878]. Тем не менее, в литературе имеются и указания на возможность симбиотического партнёрства между транспозонами и геномом хозяина, [879,880,270].

Перемещение или размножение транспозонов в геноме может вызвать вредные мутации. Для предотвращения подобных явлений у эукариотов задействованы механизмы эпигенетического регулирования активности транспозонов, основанные на RNAi – т.н. *сайленсинг* транспозонов, [864]. В последнее десятилетие значительный прогресс был достигнут в понимании механизмов сайленсинга. Для ряда модельных организмов (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, кукуруза, *Arabidopsis thaliana*) показано, что сайленсинг осуществляется как минимум двумя способами – имеет место метилирование ДНК (метилированию подлежат концевые обращенные повторы транспозонов, и это препятствует транскрипции соответствующих транспозаз), и посттранскрипционное разрушение мРНК транспозаз, блокирующее трансляцию. Обсуждаются и другие возможные механизмы, [864,866,881-883].

Несмотря на обилие данных, механизм сайленсинга ни для одного транспозона полностью разгадан не был. Необычайная сложность этого явления, большое количество вовлечённых факторов свидетельствуют о его длительной эволюционной истории, вероятно, продолжавшейся во всё время существования эукариотов. Неоднократно высказывалось предположение, что феномен RNAi возник как средство защиты от транспозонов, а затем сфера его применений расширилась, включив в себя защиту от вирусов и регулирование экспрессии собственных генов организма, (цитируются в [884], см. также [885]).

Гипотеза о возникновении феномена RNAi как средства для регулирования активности транспозонов представляется весьма убедительной. Она основана на сопоставлении известных механизмов сайленсинга транспозонов с тем, что в целом известно о механизмах RNAi, а также на филогенетических данных об основных участвующих белках – Argonaute, Dicer и RdRP. Тем не менее, гипотеза эта внутренне противоречива. Рассмотрим, например, обсуждавшийся выше механизм RNAi, в котором экспрессия гена (транспозазы) подавляется посттранскрипционно. Фрагмент одноцепочечной РНК, комплементарный участку гена транспозона, присоединяется белком Argonaute с образованием комплекса RISC. Этот комплекс затем обнаруживает мРНК, образовавшуюся в результате транскрипции того же гена, содержащую участок комплементарный фрагменту, входящему в RISC. После этого активности Argonaute используются для разрушения мРНК. Очевидно, активности Argonaute могли бы быть использованы более эффективным образом – разрушив не мРНК, а ДНК соответствующего гена. Таким путём организм смог бы избавиться от транспозона раз и навсегда. За время существования эукариотов подобный механизм защиты от транспозонов, наверное, мог быть найден. Напрашивается вывод, что в действительности механизмы RNAi используются не для подавления, а для более тонкого регулирования активности транспозонов, что истреблением транспозонов организму был бы причинён вред. Ранее «щадящий» характер воздействия механизмов RNAi на транспозоны интерпретировался в (недоступной мне) работе [879] как указание на наличие симбиотического партнёрства между транспозонами и геномами хозяев.

Транспозонам отведена важная роль в схеме возникновения эукариотов, предлагаемой в следующем разделе. В дополнение к вышеизложенным, нам понадобятся ещё две характерные особенности их генов (отсутствующие у других мобильных элементов): феномен участия транспозонов в регулировании экспрессии хозяйских генов и феномен «домашнивания» транспозаз.

Связь транспозонов с регуляторными элементами генов. *Цис*-регуляторными элементами называют участки ДНК и РНК, регулирующие экспрессию генов, находящихся на той же молекуле. *Цис*-регуляторные элементы обычно служат сайтами связывания одного или нескольких *транс*-факторов. Например, последовательность промоторного участка распознаётся РНК-полимеразой как стартовая площадка для транскрипции, а энхансер - это участок ДНК, способный связываться с белковыми факторами, увеличивающими уровень транскрипции гена или группы генов (той же хромосомы). Промотор и энхансер, тем самым, участвуют в регулировании транскрипции. Образовавшаяся в результате транскрипции молекула пре-мРНК содержит определённые последовательности, с помощью которых регулируется её процессинг, указывающие, например, места сплайсинга или прикрепления 3'-полиаденинового хвоста. Специальные последовательности сигнализируют о наличии альтернативного сплайсинга (т.е. когда имеется несколько интронов и примыкающие к ним экзоны могут быть соединены разными способами). Далее, сформировавшаяся в результате процессинга зрелая мРНК состоит из трёх последовательно расположенных участков. Трансляции подлежит лишь средний участок, а первый и третий образуют т.н. нетранслируемые области: участок выше старт-кодона именуется 5'-UTR, а участок после стоп-кодона называется 3'-UTR. Последовательностями в нетранслируемых областях определяются многие детали дальнейшей судьбы мРНК, включая её стабильность, локализацию, эффективность трансляции, [886]. Примечательный факт состоит в том, что все приведённые здесь примеры регуляторных последовательностей часто обнаруживают связь с транспозонами.

Чаще всего связь с транспозонами обнаруживается у промоторов и энхансеров. Известно, например, что около 25% промоторов (собственных) генов у человека содержат последовательности, происходящие от ретротранспозонов, [887,888]. Нетранслируемые области 5'-UTR также могут быть связаны с транспозонами. Например, у человека, согласно оценкам авторов [889], области 5'-UTR для 4% генов содержат последовательности ретротранспозонов Alu. На основании опытов *in vivo* авторы полагают, что этот элемент, скорее всего, служит энхансером транскрипции. В дополнение к сказанному, описаны случаи, когда транспозоны маркируют сайты альтернативного сплайсинга и полиаденилирования, [890-892].

Общее количество регуляторных участков генов, восходящих к транспозонам, не может быть оценено вследствие того, что, в отличие от кодируемых теми же генами белков, регуляторные участки не сохраняются в процессе эволюции. Поэтому происхождение некодирующих участков генов не может быть отслежено методами филогенетического анализа, [893]. Чаще всего транспозоны наблюдаются в регуляторных участках генов, стремительно эволюционирующих в настоящее или недавнее время, таких как гены, ответственные за иммунитет или за отклик на внешние стимулы. Транспозоны не обнаруживаются в мРНК высоко-консервативных генов, отвечающих за фундаментальные аспекты развития и метаболизма, – к таким выводам пришли авторы [892], исследовавшие распределения восходящих к транспозонам участков в нетранслируемых областях 5'-UTR мРНК мыши и человека. Отсутствие связи с транспозонами с регуляторными участками генов, ответственных за фундаментальные аспекты метаболизма, может быть связана с тем, что их эволюция закончилась в глубокой древности, и транспозоны, вошедшие в их регуляторные участки, уже вымерли. В этой связи возникает искушение предположить, что в действительности все регуляторные элементы определённых классов, скажем, энхансеры и промотеры, происходят от транспозонов. Свидетельством в поддержку такой

точки зрения может служить регуляторный элемент, исследованный авторами [893]. Данные авторы обнаружившимли в геномах четвероногих повторяющуюся последовательность, проявляющую свойства энхансера. Эта последовательность не могла быть сопоставлена ни с одним из известных транспозонов обнаруживаемых у четвероногих, однако авторы показали сходство её с активным ретротранспозоном в геноме лопастепёрой рыбы *Latimeria menadoensis*, живого ископаемого. Смоделировав эволюционную историю транспозона, авторы пришли к выводу, что он был активен в силурийский период, более 400 млн лет назад, но каким-то чудом сохранился в геноме латимерии, которую авторы называют *a living molecular fossil*. В целях простоты в предлагаемой в следующем разделе схеме возникновения эукариотов все регуляторные участки генов объявляются восходящими к транспозонам.

Одомашнивание транспозаз (domesticated transposases). Явление, обозначаемое этим термином, в некотором роде составляет противоположность обсуждавшемуся выше феномену присутствия связанных с транспозонами последовательностей в нетранслируемых областях генов. Об одомашнивании транспозазы (т.е. белка, катализирующего реакцию транспозиции ДНК-транспозона) говорят, если гомологичная транспозазе последовательность обнаруживается в ORF гена собственного белка организма. Тем самым, каталитические активности транспозаз оказываются задействованными в решения собственных задач хозяйского организма. Транспозазы (в отличие от регуляторных участков) часто обнаруживают консервативное поведение, поэтому феномен их одомашнивания может быть исследован методами филогенетического анализа. Выработаны чёткие критерии, позволяющие отличить одомашненные транспозазы от транспозонов, случайно поместившихся внутри собственных генов организма. Выявленные примеры одомашнивания исчисляются десятками. Среди одомашненных транспозаз особенно много белков, участвующих в регуляции транскрипции, однако точные функции были выяснены лишь для некоторых из них, [894].

В контексте проблемы происхождения эукариотов, особый интерес представляют примеры обнаружения транспозаз в древних белках с известными функциями. Примером такого одомашнивания может служить обратная транскриптаза, входящая в состав теломеразы, позаимствованная у ретротранспозона семейства *Penelope* на ранней стадии эволюции эукариотов, [703]. Фермент теломеразы решает фундаментальную для всех эукариотов задачу компенсации укорочения линейной ДНК при репликации. В отличие от прокариотов, чьи хромосомы имеют форму кольца, хромосомы эукариотов линейной формы, и вследствие технических особенностей процесса репликации это приводит к небольшому укорочению 3'-конца ДНК в каждом раунде репликации. Теломераза надстраивает утраченную ДНК путём обратной транскрипции по имеющейся РНК-матрице, в реакции аналогичной той, что имеет место при транспозиции. Использование ретротранспозона для надстраивания утрачиваемой при репликации ДНК, видимо, является проявлением некоей общей закономерности. Так, у плодовых мух *Drosophila* теломеразы отсутствуют. Их роль выполняют специализированные ретротранспозоны *HeT-A*, *TART* и *TAHRE*, [703,895].

Одомашненные транспозазы с идентифицированными функциями нередко оказываются участниками мейоза. Примером может служить белок $\alpha 3$ MULE дрожжевого грибка *Kluyveromyces lactis*. Этот восходящий к транспозазе клеточный белок участвует в реакции переключения типа спаривания – перехода от митоза к мейозу, [896]. В качестве ещё одного примера может быть упомянут белок HIM-17 нематоды *Caenorhabditis elegans*, участвующий в инициации мейотической рекомбинации. Этот белок происходит от транспозазы *P-element* мухи *D. Melanogaster*, [897].

Специального рассмотрения заслуживает феномен, получивший название **конвергентного одомашнивания** (convergent domestication), когда имеет место

неоднократное одомашнивание различных транспозаз, филогенетически между собой связанных, а образующиеся при этом белки задействованы в сходных процессах. Убедительные свидетельства такого рода эволюции имеются для белка CENP-B и его гомологов, представляющих собой результат одомашнивания различных ДНК-транспозонов из группы *pogo* (*pogo superfamily*).

Белок CENP-B (Centromere protein B) высоко-консервативен, принимает участие в формировании центромеры. Центромера – это участок хромосомы, играющий важную роль в процессе деления клеточного ядра. Хроматин на этом участке имеет специфическую структуру (т.н. гетерохроматин), необходимую для правильного расхождения хромосом в митозе и мейозе. У большинства организмов образование центромеры регулируется эпигенетически, [898]. Процесс модификации хроматина, приводящий к образованию нужной структуры, включает в себя метилирование, осуществляется при участии белков Piwi, Dicer и РНК-зависимой РНК-полимеразы, указывающих на использование RNAi, [899]. Характерную особенность центромеры составляют т.н. обращённые повторы (*inverted repeats*), обнаруживающие сходство с ДНК-транспозонами, остатками которых они, вероятно, и являются, [899]. Авторами [900] на примере делящихся дрожжей *S. pombe* показано присутствие в цитоплазме транскриптов обращённых повторов, комплементарных участкам центромеры. Иными словами, начальная стадия образования центромеры осуществляется при участии всех атрибутов RNAi и в целом напоминает механизм сайленсинга транспозона, [899-901]. Однако, помимо стандартных механизмов RNAi, образование центромеры протекает с участием CENP-B и ряда других факторов. По всей видимости CENP-B инициирует образование центромеры, избирательно связываясь с определённой последовательностью α -сателлитной ДНК, [902-903].

В различных эукариотах имеются десятки белков, гомологичных CENP-B, [904]. Эти белки принимают участие в таких процессах, как модификация гетерохроматина при образовании центромеры, инициация репликации ДНК, сайленсинг ретротранспозонов. Биологические их функции близки или обнаруживают сходство задействованных механизмов, [904,905]. Сходство аминокислотной последовательности белка CENP-B человека с последовательностью одного из транспозонов мухи *Drosophila melanogaster* было обнаружено в 1992 г., [906]. Впоследствии, по мере накопления данных, оказалось, что обсуждаемые белки распадаются на группы, восходящие к *различным* транспозонам группы *pogo*. Доместикация транспозаз этой группы осуществлялась независимым образом не менее трёх раз, [907,908,904]. Транспозазы были кооптированы повторно для осуществления фундаментальных клеточных процессов, причём активности белков, происходящих от двух различных транспозаз, включают в себя связывание с центромерой, [908]. Наличие сходных функций у групп белков, восходящих к различным, но родственным, транспозазам, интерпретируется как особый случай конвергентной эволюции – конвергентное одомашнивание, [908].

Феномен одомашнивания транспозаз, а также сходство процесса образования центромеры с сайленсингом транспозонов получают объяснение в предлагаемой далее схеме возникновения эукариотов. В нём явление, именуемое конвергентным одомашниванием, возникает естественно, вне связи с конвергентной эволюцией.

Метилирование ДНК и эпигенетическое наследование. Эукариоты обладают механизмами эпигенетического регулирования экспрессии генов, благодаря которым экспрессия одного и того же набора генов может осуществляться по-разному в зависимости от внешних условий. Информация о том, экспрессия каких генов должна быть подавлена, а каких – интенсифицирована, кодируется путём ковалентной модификации ДНК и хроматина, не затрагивающей последовательности ДНК. Примечательный факт состоит в том, что эти инструкции передаются по наследству при

митозе (делении соматических клеток). Не менее примечательно и то, что при мейозе эпигенетическая информация целенаправленно стирается.

Информация об эпигенетической регуляции кодируется путём метилирования ДНК, [909]. С химической точки зрения метилирование ДНК – это реакция присоединения группы $-CH_3$ к цитозину (метилируется пятый атом углерода пиримидинового кольца цитозина). По всей видимости, метилирование представляет собой лишь некую разметку молекулы ДНК. Предполагается, что сигналом, непосредственно регулирующим экспрессию генов, служат изменения, происходящие не в самой ДНК, а в хроматине, [910]. Имеют место тесные двусторонние связи между метилированием ДНК и метилированием лизина гистонов, [911]. Модифицирование хроматина за счёт изменений, происходящих в гистонах и других содержащихся в нём белках, запускают механизмы регуляции, в результате которых экспрессия одних генов подавляется, а других – интенсифицируется, [910].

Распределение метилирования ДНК по филогенетическому древу эукариотов приводит к выводу о наличии этого механизма у общего предка всех эукариотов, а отсутствие его у ряда организмов интерпретируется как результат утраты в ходе эволюции, [912]. Наиболее детально механизмы и биологическое значение метилирования изучены для млекопитающих и растений, причём и функции его и задействованные механизмы в этих группах оказались сходными, [913,914]. К числу наиболее изученных эпигенетически регулируемых процессов, включающих в себя метилирование ДНК, относятся образование и поддержание центромеры и теломеразы, [915,916]. Метилирование ДНК задействовано также в X-сцепленном рецессивном наследовании и в геномном импринтинге (эпигенетический процесс, в котором экспрессия маркированных генов осуществляется по-разному, в зависимости от того, от кого из родителей поступили аллели), [917].

Процесс разметки ДНК и гистонов посредством метилирования необычайно сложен и не до конца понят. Механизмы метилирования *de novo*, по крайней мере, основные, представляют собой разновидности упоминавшегося выше феномена RNAi. В них, как правило, задействованы такие ферменты, как ДНК-зависимая РНК полимераза, РНК-зависимая РНК полимераза, Dicer и Argonaute (т.е. стандартные атрибуты RNAi). Процессы эти, включающие в себя синтез двухцепочечной РНК в качестве промежуточного продукта, получили название *RNA-directed DNA methylation*, [918-920]. Имеется указание и об альтернативном пути метилирования ДНК, без участия РНК, [921].

Помимо метилирования *de novo*, в клетках эукариотов функционируют механизмы поддержания (maintenance) метилирования ДНК, копирующие метильные маркеры в процессе репликации ДНК при митотическом делении клеток. Феномен переноса метильных маркеров на образуемую при репликации цепочку ДНК, обеспечивающий удержание эпигенетических признаков при делении соматических клеток, неоднократно проверялся на клетках животных, грибов и растений, [916,922-924]. Молекулярные механизмы, посредством которых метильные маркеры копируются с ДНК-матрицы на синтезируемую цепочку при репликации, полностью разгаданы не были, [910,925-928].

Наряду с метилированием, важную роль в эпигенетическом регулировании играет деметилирование ДНК – целенаправленное удаление метильных групп с нуклеотидов. Различают активное деметилирование и пассивное. Пассивный процесс имеет место при репликации ДНК, если синтезируемые цепочки ДНК не метилируются. При активном деметилировании имеет место непосредственное отделение метильных групп, осуществляемое специализированными ферментами.

Деметилирование ДНК исследуется главным образом как часть феномена эпигенетического перепрограммирования (epigenetic reprogramming), в результате которого клетки восстанавливают плюрипотентность (способность к дальнейшей дифференциации), [929]. В контексте проблемы происхождения эукариотов примечательным представляется тот факт, что деметилирование генома имеет место при

половом размножении и в начальной стадии развития эмбриона, [930]. Наиболее детально это явление исследовалось на мышах. При оплодотворении отцовский и материнский наборы генов соединяются вместе и подвергаются масштабному перепрограммированию. Оба генома располагаются в цитоплазме зиготы, однако механизмы их перепрограммирования различны. В зиготе мыши отцовский геном подвергается полномасштабному активному деметилированию (genome-wide demethylation) в начале профазы I мейоза, [931]. Частичное деметилирование материнских генов имеет место в ооцитах, ещё до образования зиготы, [932]. Затем, в течение нескольких циклов деления зиготы имеет место пассивное деметилирование материнских генов, а после этого остающиеся метильные группы удаляются путём активного деметилирования, [933]. Позднее, на стадии бластоцисты ДНК подвергается интенсивному метилированию, а сразу после обособления в зародыше первичных половых клеток (primordial germ cells) содержащаяся в них ДНК вновь подвергается активному деметилированию, в течение которого стирается импринтинг, [930,934]. В результате деметилирования ДНК стирается подавляющая часть закодированной эпигенетической информации, однако метилирование отдельных регуляторных участков сохраняется, тем самым при мейозе некоторая часть эпигенетической информации, по крайней мере, в принципе может быть передана по наследству, [935].

Процессы деметилирования, сопровождающие слияние мужской и женской клеток при оплодотворении, изучались на примере ряда млекопитающих (мышь, человек, кролик, корова, крыса, свинья, овца, коза, [936-943]), цветковых растений, [913,914,944], рыб, [945,946], однако в целом они недостаточно исследованы. Технические трудности исследования усугубляются тем, что процессы деметилирования сами по себе отличаются сложной динамикой, сцеплены с полом, [932,947]. Имеющиеся данные не позволяют пока уверенно заключить, что деметилирование ДНК при половом размножении, приводящее к стиранию эпигенетической памяти о родительских организмах, составляет общую особенность эукариотов. Но скорее всего это действительно так.

В последующем изложении постулируется, что современные версии мейоза и полового размножения представляют собой видоизменения более древнего процесса, в котором эпигенетическая информация о родителях педантически стиралась посредством деметилирования ДНК. В этом состояло одно из фундаментальных отличий мейоза от митотического деления клеток, в котором эпигенетическая информация столь же педантично копировалась.

Многоклеточность. Многие эукариоты являются многоклеточными организмами, состоящими из дифференцированных клеток (отличающихся строением и выполняемыми функциями). Многоклеточные организмы возникали неоднократно в разных таксонах эукариотов. В то же время многоклеточные прокариоты встречаются крайне редко. Данное обстоятельство накладывает определённые ограничения на возможную схему возникновения эукариотов – предпосылки к многоклеточности должны логически вытекать из их эволюционной истории.

5.11.2. Интерпретация.

Всякий раз, как я подумую: «Ну, вот и песенке конец», — тут-то как раз и начинается для меня новая, ещё высшая, лучшая жизнь!

Лён. Ганс Христиан Андерсен

Изложенные выше факты могут быть объяснены исходя из допущения, что до возникновения эукариотов Земля была заселена предками архей и предками бактерий. Жизненный цикл предков архей основывался на репликации РНК, они обладали *bona fide* полимеразой и *bona fide* рибосомой. С предками архей сосуществовали предки бактерий,

чей жизненный цикл был основан на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, причём, по крайней мере, одна из этих операций осуществлялась стемпингом апатитовой основы. При этом предки бактерий овладели трансляцией, но остаётся неясным, успели ли они обзавестись рибосомой. В частности, непротиворечивый сценарий может быть получен в предположении о наличии у предков бактерий *bona fide* рибосомы и отсутствии *bona fide* полимераз. В целях определённости мы далее будем следовать этому предположению (тем самым постулируется, что все предки бактерий осуществляли обе реакции копирования полинуклеотидов – транскрипцию и обратную транскрипцию – стемпингом апатитовой основы.) Мы постулируем также, что в предках бактерий обитали некоторые мобильные генетические элементы, жизненный цикл которых, как и у хозяев, основывался на чередовании транскрипции с обратной транскрипцией. Представители одной группы, назовём их *протофагами*, кодировали собственные интроны группы I, используемые ими для каталитического образования фосфодиэфирных связей при стемпинге. Возможно, они кодировали и собственную рибосому. Мы постулируем наличие ещё одного класса мобильных генетических элементов, которых мы будем называть *протоплазмидами*. Наконец, постулируется также, что на протоплазмидах паразитировали мобильные генетические элементы, аналогичные современным интронам группы II. Интроны группы I и группы II предполагаются способными катализировать аутосплайсинг и обратный сплайсинг, подобно их современным аналогам, однако интроны группы I не кодировали сложных белковых устройств, таких как самонаводящаяся эндонуклеаза, а интроны группы II не кодировали белков, подобных описанным выше ИЕР (т.е. *retrohoming* у интронов группы II отсутствовал).

Принимаемые нами допущения о предках архей, предках бактерий, интронах, протофагах и протоплазмидах не являются произвольными. Они согласуются с выводами предшествующих разделов (об использовании интрона группы I для каталитического соединения нуклеотидов фосфодиэфирными связями при стемпинге (раздел 5.1.2), о жизненных циклах предков архей и предков бактерий (раздел 5.4.1), об участии интрона группы I в трансляции (раздел 5.5.3), о том, что интроны группы I, вероятно, кодировались протофагами, а интроны группы II, возможно, паразитировали на протоплазмидах (раздел 5.6.2)).

Напомним, согласно результатам палеобиологических исследований, обсуждавшихся ранее, в разделе 5.8, Земля 3.5 млрд. лет назад была уже населена простейшими эукариотами. Тем самым, возникли эукариоты в условиях, мало похожих на современные. Морская вода в то время, вероятно, имела травяно-зелёный цвет вследствие высокой концентрации ионов Fe^{2+} . Небесный свод в отсутствие кислорода был не голубым, а багровым. Отсутствовал и слой озона в верхних слоях атмосферы, и поэтому солнечное ультрафиолетовое излучение беспрепятственно достигало земной поверхности. Почва и глубины океана, предоставляли защиту от ультрафиолетового излучения, но в то же время сами могли служить источником радиоактивности. Концентрация урана в них была намного выше, чем теперь, судя по россыпям уранинита в ныне метаморфизованных седиментогенных конгломератах месторождения Витватерсранд (Witwatersrand) образовавшихся 2970 млн. лет назад. Да и уран сам по себе был более интенсивным источником радиоактивности, нежели теперь, ввиду более высокого содержания радионуклида ^{235}U (для сравнения, современное содержание этого изотопа 0.72% , 3 млрд. лет назад оно составляло 8.4%, а 4 млрд. лет назад - 19.2%, [851]).

Предположим, что сопровождающиеся рекомбинацией генов явление трансформации у бактерий и слияние клеток у архей *Haloferax* (описанные выше) возникли как адаптации к повышенному уровню ионизирующих излучений в среде обитания. Эти виды межклеточных взаимодействий, вероятно, возникли как партнёрские отношения, приносящие выгоду обеим участвующим клеткам. Например, при трансформации, компетентная клетка предка бактерии могла атаковать некомпетентную клетку и извлечь

из неё полинуклеотид, используемый в качестве носителя наследственной информации, для починки собственного полинуклеотида. Выгода атакуемой клетки состояла в том, что хотя бы часть её наследственной информации будет передана последующим поколениям посредством кроссинговера, тогда как в противном случае она, будучи подвержена тому же излучению, погибнет, не оставив никакого потомства.

Отметим, с предположением о высоком уровне ионизирующих излучений, требующем разработки специальных механизмов для починки разрывов в полинуклеотидах, согласуется также тот факт, что для современных архей характерна полиплоидия, [826]. Предки архей – древнейшие из клеточных существ, должны были выработать приспособления для жизни в условиях наиболее высокого уровня радиации. Клетка могла содержать десятки копий каждой из хромосом (подобно некоторым современным археям) и использовать их для репарации своей РНК (посредством гомологичной рекомбинации) при более или менее умеренных уровнях радиации, а в случае ещё более высокой радиоактивности две клетки могли прибегнуть к слиянию и удвоению числа доступных хромосом. Каждая из участвующих в слиянии клеток удваивала шанс найти подходящий для рекомбинации не разрушенный участок РНК, а по завершении репарации клетки расходились, подобно современным *Haloferox*, восстанавливая свою индивидуальность в несколько модифицированном виде.

Происхождение мейоза (основное допущение). Предположим, примерно 3.5 млрд. лет назад уровень радиации на земле возрос до значений, трудно совместимых с жизнью (согласно стандартам, имевшим хождение в те времена). Причины катаклизма могли быть разными. Вспышка сверхновой в окрестности Солнца могла, например, привести к заражению земной атмосферы и океана короткоживущими радионуклидами.

Предположим, в силу каких-то мутаций, произошедших вследствие возросшего уровня радиации, компетентная клетка предка бактерии по ошибке атаковала клетку предка архей и овладела её РНК-хромосомой. Предположим, захваченная молекула РНК была подвергнута обратной транскрипции и инкорпорирована в геном новоявленного гибрида. Такие гибриды, возможно, возникали в тех условиях бесчисленное множество раз и все погибали из-за несовместимости транслируемых белков. Предположим, под действием радиации в одной из гибридных клеток часть несовместимых генов была разрушена, так что после трансляции сохранившихся генов получился жизнеспособный организм, содержащий гены предка бактерии и предка архей. Мы полагаем – и это наше главное допущение – что в образовавшейся клетке, имела место одновременная трансляция генов предка архей и генов предка бактерии. В результате трансляции этих генов имели место попытки самовоспроизведения новоявленного гибрида сообразно распорядку, заведённому у предков архей и бактерий, соответственно. Комбинирование этих процессов и привело к возникновению процесса, впоследствии преобразовавшегося в мейоз.

Предположим, что волею случая новообразованная клетка-гибрид была способна к репликации РНК сообразно жизненному циклу предков архей, а также и к чередованию транскрипции с обратной транскрипцией, как в жизненном цикле предков бактерий. Предположим теперь, что новоявленная клетка-гибрид реплицировала свой геном и разделилась на две, так, как делились предки архей, однако две образовавшиеся клетки не разошлись, а слились вновь, сообразно реакции предков архей на повышение уровня радиации, подобно тому, как сливаются *Haloferox*, и после разошлись, т.е. разделились без репликации, в точности как то имеет место у *Haloferox* после слияния. Предположим, наконец, что вышеописанная аномалия была генетически фиксирована, так что один из жизненных циклов нашего организма осуществлялся по схеме

репликация РНК/деление/слияние/деление.

(М)

Данный жизненный цикл мог чередоваться со стандартным жизненным циклом предков бактерий, унаследованным от одного из предков:

транскрипция/обратная транскрипция. (AM)

Размножались клетки путём простого деления, с использованием жизненного цикла (AM), согласно распорядку, заведённому у предков бактерий. К жизненному циклу (M) прибегали, когда уровень радиации достигал опасных значений. Слияние клеток с последующей рекомбинацией молекул РНК при следовании первому циклу повышало шансы успешного осуществления репарации двухцепочечных разрывов в полинуклеотидах. При этом число особей до и после цикла, скорее всего, не менялось, т.е. цикл (M) не имел какого-либо отношения к размножению.

Существенным недостатком цикла (M) было то обстоятельство, что в нём клетка могла использовать для рекомбинации лишь собственную двухцепочечную РНК. По всей видимости, использование этого цикла было оправдано при аномально-высоких уровнях радиации, когда затраты времени на поиск подходящего партнёра для слияния могли стоить жизни. Впоследствии, после некоторого снижения уровня радиации, фазы цикла (M) могли быть переставлены в следующем порядке:

репликация РНК / слияние/деление/деление. (M')

Эволюция в условиях интенсивной радиации, производящей всё больше двухцепочечных разрывов РНК, должна была способствовать вовлечению всё больших участков молекул РНК в рекомбинацию при осуществлении цикла (M'), пока гомология ни распространилась по всей длине молекулы, как то имеет место в современном мейозе. Возникший таким образом жизненный цикл от современного мейоза отличался тем, что репликации подлежала молекула РНК, а не ДНК.

Существо, образовавшееся в результате описанных здесь событий, копирующее свой геном сообразно двум циклам, обозначенных как (AM) и (M'), мы будем называть *предком эукариотов*. Процесс, осуществляемый сообразно циклу (M') мы будем называть мейозом, а процесс, осуществляемый сообразно (AM) назовём предко-бактериальным жизненным циклом.

Начиная с этого места, мы будем различать два типа геномов у предка эукариота, обозначив их как M1C и MAC (терминология является аллюзией на M1C-ДНК и MAC-ДНК, содержащуюся, соответственно, в микронуклеусе и макронуклеусе инфузорий). MAC-геном состоял из ДНК и РНК, воспроизводился амитозом, т.е. чередованием транскрипции и обратной транскрипции. M1C-геном представлял собой двухцепочечную РНК, воспроизводился репликацией РНК в процессе (M'), более или менее аналогичном современному мейозу (с заменой ДНК на РНК). На начальной стадии эволюции предка эукариотов различие геномов M1C и MAC – это не более, чем формальный приём. Два генома, скорее всего, не сосуществовали в одной клетке. Тем не менее, принципиально важно отметить направление, в котором осуществлялась передача наследственной информации на начальном этапе эволюции. Его можно обозначить схемой MAC → M1C → MAC. M1C-геном строился на основе MAC-генома: при угрожающе-высоком уровне радиации, РНК-копия MAC-генома подвергалась репликации. Так возникал M1C-геном. Затем в процессе мейоза и спаривания, сообразно (M'), образовывалась одноцепочечная РНК, на которой строилась новая версия MAC-генома. После этого MAC-геном воспроизводился произвольное число раз в цикле (AM), пока радиация вновь не достигала опасной величины.

Антиинтроны. Описанный выше эволюционный процесс привёл к возникновению популяции гибридных существ, предков эукариотов, геном которых содержал гены предков архей и предков бактерий. В силу сингулярного характера процесса их возникновения, образование предков эукариотов не сопровождалось появлением промежуточных форм между предками архей и предками бактерий. Новоявленный организм, сочетавший в себе способность к мейозу и предко-бактериальному жизненному циклу, вскоре должен был исчезнуть. Интенсивность ионизирующих излучений в среде обитания рано или поздно должна была опуститься до обычных (для того времени)

значений. Частота обрывов двухцепочечной РНК при этом уменьшилась бы, так что репарацию обрывов РНК можно было осуществлять, не прибегая к мейозу и гибридизации всего генома. В силу этого мейоз сделался бы обременителен и неминуемо должен был исчезнуть. С ним был бы утрачен и шанс на возникновение более совершенного организма – *bona fide* эукариота, если бы не одно обстоятельство.

Напомним, в исходных допущениях мы полагаем, что в предках бактерий обитали протофаги, кодирующие собственные интроны группы I, и протоплазмиды, на которых паразитировали интроны группы II. Предположим теперь, что эти или подобные им мобильные генетические элементы проникли в клетки предков эукариотов. Мы полагаем, что гены, ответственные за образование мембраны предков эукариотов, были унаследованы от предков бактерий, а обитавшие в предках бактерий протофаги и протоплазмиды, вероятно, были оснащены молекулярными приспособлениями для проникновения внутрь клеток, окружённых такими мембранами. С протофагами и протоплазмидами в клетку предка эукариота могли попасть и интроны. И там они вошли в соприкосновение с двухцепочечной РНК. Репликация РНК предполагает наличие антисмысловой РНК, однако антисмысловая РНК и мобильные интроны – «две вещи несовместные». Вероятно, мейоз был приспособлен для борьбы с проистекающим отсюда затруднением и потому не был утрачен.

Антисмысловой РНК называют одноцепочечную РНК, комплементарную мРНК. Процедура репликации РНК предполагает сосуществование в организме двух комплементарных цепочек РНК. Одну из них, аналогичную мРНК современных организмов, мы будем называть кодирующей, а комплементарную ей цепочку назовём антисмысловой. Репликация РНК имела место в организме предка эукариота при мейозе. По всей видимости, проникшие в клетку интроны могли внедряться (путём аутосплайсинга) в цепочки РНК обоих типов. Внедрение в кодирующую цепочку должно было приводить к размножению интронов, как то имело место при внедрении их в кодирующую цепочку ДНК предка бактерии. Если же интрон внедрялся в антисмысловую РНК, его реплика, образуемая при репликации РНК, каталитической активностью уже не обладала. Так возникал *антиинтрон* – последовательность РНК, комплементарная интрону, содержащаяся в цепочке РНК. Внедрившийся в цепочку РНК антиинтрон уже не имел возможности её покинуть, так как не имел активностей, необходимых для осуществления аутосплайсинга.

При копировании полинуклеотидов путём чередования транскрипции и обратной транскрипции антисмысловые РНК возникать не должны. Поэтому у предков бактерий феномен антиинтронов не имел места. Проникновение интронов в клетки предков архей либо вообще не имело места, либо вело к гибели организма за счёт возникновения антиинтронов, препятствующих нормальному осуществлению трансляции. Тем самым, ни предки бактерий, ни предки архей не обладали эффективными средствами защиты от антиинтронов. Поэтому после проникновения интронов в клетку предка эукариотов, повлекшего за собой образование антиинтронов, возникла необходимость в создании таких средств *de novo*. Проще всего было бы заблокировать репликацию РНК, перейдя к предко-бактериальному жизненному циклу (чередованию транскрипции и обратной транскрипции), однако для этого пришлось бы отказаться от мейоза, что не представлялось возможным ввиду высокого уровня радиации. В этих условиях принципиально новое средство защиты от антиинтронов могло быть создано на основе механизмов генетической рекомбинации и кроссинговера при мейозе.

Мейоз как механизм удаления антиинтронов. Как было упомянуто ранее, при описании мейоза, спаривание гомологичных (не являющихся сестринскими) хроматид при гомологичной рекомбинации может приводить к появлению некомплементарных звеньев в двухцепочечной молекуле ДНК, т.н. *мисмэтчей*. После завершения кроссинговера эти нарушения распознаются и устраняются специальными ферментными системами,

работающими по типу эксцизионной репарации. Механизмы выявления нарушений принципа комплементарности и репарации РНК были необходимым условием успешного функционирования мейоза предка эукариота. Незначительной модификацией тех же механизмов могло быть получено устройство для обнаружения и иссечения антиинтронов. Если в одну из гомологичных РНК-хроматид внедряется антиинтрон (или какой-либо иной мобильный генетический элемент), а в другой он отсутствует, то, после кроссинговера, полное нарушение принципа комплементарности на всём протяжении антиинтрона при наличии гомологии (полной или частичной) с флангов можно было использовать для обнаружения и иссечения инородной РНК.

Для эффективного удаления антиинтронов при мейозе важно было избегать имбридинга при скрещивании. Вероятно, в те времена были выработаны и механизмы, посредством которых спаривание могло иметь место лишь для индивидов, отстоящих друг от друга как минимум на несколько мейотических поколений (ныне утраченные).

Впоследствии уровень радиации снизился, мейоз утратил своё значение как средство репарации двусторонних разрывов РНК и использовался главным образом для удаления антиинтронов. Поскольку в отсутствие радиации двухцепочечные разрывы молекул РНК возникали недостаточно часто, для инициирования кроссинговера приходилось создавать разрывы искусственно. Для этого была рекрутирована субъединица А топоизомеразы Торо VI архей, в ходе последующей эволюции превратившаяся в эндонуклеазу Spo11 современных эукариотов.

После снижения уровня радиации, предки эукариотов более не нуждались в мейозе, вовлекающем весь МС-геном в гомологическую рекомбинацию, для устранения двухцепочечных разрывов. Однако необходимость удаления антиинтронов сохранилась, поэтому предки эукариотов по-прежнему комбинировали два альтернативных жизненных цикла. Предко-бактериальный цикл использовался для размножения, в нём МС-геном копировался чередованием транскрипции и обратной транскрипции. К другому циклу, основанному на репликации РНК, мейозе и спаривании прибегали при появлении признаков «засорения» МС-генома антиинтронами. В последнем цикле воспроизводился МС-геном.

Считается, что мейотическое деление клеток, сопровождающееся кроссинговером, создаёт важные преимущества по сравнению с «обычным» соматическим делением. Остаётся неясным, в чём конкретно эти преимущества заключаются, потому что, как уже было сказано выше, проявляются они на уровне популяции и потому не могут быть исследованы экспериментально. Иными словами, есть некое пороговое значение общего числа организмов в популяции, ниже которого преимущества мейотического деления никак не проявляются. Необходимость удаления антиинтронов, вероятно, и стала причиной возникновения значительной популяции предков эукариотов, регулярно прибегающих к спариванию и мейотическому делению. В итоге преимущества жизненного цикла, основанного на мейотическом делении, смогли проявиться в полной мере (в чём бы они ни состояли).

Явления, подобные мейозу, сопровождающиеся спариванием и гомологической рекомбинацией, вероятно, имели место не один раз на протяжении геологической истории Земли при повышении уровня радиоактивности. Однако предки бактерий и предки архей всегда эти механизмы утрачивали после возвращения уровня радиации к нормальным значениям. В их клетках не было одновременного сосуществования репликации РНК и чередования транскрипции с обратной транскрипцией. Поэтому не возникало и антиинтронов, или же с ними боролись иными методами, без использования мейоза.

Использование мейоза для удаления антиинтронов, вероятно, не давало гарантии удаления всех внедрившихся антиинтронов. В случае случайно имевшего места имбридинга антиинтрон избегал удаления и мог распространиться среди потомков. Удаление такого антиинтрона путём сличения геномов при гомологичной рекомбинации более не представлялось возможным. Поэтому рано или поздно мейоз должен был

полностью утратить значение как способ удаления антиинтронов, уступив место более совершенным молекулярным приспособлениям (обсуждаемым далее). Однако к тому времени, после возникновения двухцепочечной ДНК, спаривание и мейоз вновь оказались востребованы и потому не были утрачены.

Интеины. Как было выше отмечено, встраивание интрона в антисмысловую РНК должно было привести к появлению антиинтрона в пре-мРНК, который не мог быть удалён аутосплайсингом. Трансляция такой молекулы приводила к появлению белка с вставленной аминокислотной последовательностью, нарушавшей его функционирование. (А обратная транскрипция молекулы РНК, содержащей антиинтрон, приводила к появлению антиинтрона в образуемой молекуле ДНК.)

Предположим, при трансляции содержащей антиинтрон пре-мРНК был получен белок, способных выполнять свои функции в клетке, хоть и не столь эффективно, как до внедрения антиинтрона в его ген. Поскольку кодируемая антиинтроном аминокислотная последовательность не выполняла полезных функций, возникновение и накопление мутаций в антиинтроне не сказывалось на функционировании белка. Если накопление мутаций случайно приводило к возникновению аминокислотных последовательностей, способных осуществить аутосплайсинг в процессе посттрансляционного созревания белковых молекул, то антиинтрон становился интеином. Такой интеин ещё не кодировал самонаводящейся эндонуклеазы (HEase, см. ниже).

Сплайсосомные интроны и сплайсосома. По всей видимости, процесс образования новых интронов и антиинтронов шёл во всё время, пока репликация РНК составляла часть жизненного цикла предков эукариотов. Наличие двух видов РНК – кодирующей и антисмысловой – создавало предпосылки для обратного сплайсинга интрона в кодирующую последовательность, приводящую к появлению антиинтрона в реплике, а это не позволяло осуществить трансляцию гена должным образом. Описанный выше способ удаления антиинтронов при половом размножении мог быть использован, только если антиинтрон содержался в геноме одного из двух индивидов, участвующих в скрещивании. Недостаточная эффективность используемой процедуры приводила к распространению в геномах антиинтронов, расположенных в идентичных сайтах гомологичных генов.

Один из путей решения проблемы антиинтронов мог быть в использовании каталитической активности интронов для их удаления из пре-мРНК. Сплайсосома, вероятно, возникла как приспособление, использующее для удаления антиинтронов каталитическую активность интронов группы II. Для этого концевые последовательности антиинтронов были изменены и унифицированы, так чтобы интроны группы II могли осуществить их сплайсинг с образованием *лассо*. В ходе дальнейшей эволюции задействованные в сплайсинге интроны группы II были преобразованы в молекулы snRNA, входящие в состав сплайсосомы. Затем каталитическая активность молекул РНК, используемых для сплайсинга антиинтронов, была также задействована и для сплайсинга интронов из пре-мРНК, что создавало определённые преимущества, по мере того, как интроны утрачивали способность к аутосплайсингу вследствие накопления мутаций. В итоге концевые последовательности интронов и антиинтронов в геноме предков эукариотов оказались одинаковыми, соответствующими сигнальным последовательностям, распознаваемым сплайсосомой, а все остальные их особенности оказались стёрты вследствие накопления мутаций. Тем самым, сплайсосомные интроны представляют собой остатки антиинтронов, интронов группы I и интронов группы II. В процессе перехода на репликацию ДНК и упразднения репликации РНК и обратной транскрипции (см. ниже) эти последовательности были скопированы в новообразованные молекулы ДНК вместе с содержащими их генами. Видимо, так и возникли сплайсосомные интроны современных ядерных геномов. Отсутствие интронов группы II в ядерных

геномах, в частности, объясняется превращением их в сплайсосомные интроны в процессе эволюции.

Отсутствие интронов, подобных сплайсосомным, в геномах органелл. Будучи потомками предков бактерий, митохондрии и пластиды основывали свои жизненные циклы на чередовании транскрипции и обратной транскрипции. В них никогда не осуществлялась репликация РНК, а потому не было и предпосылок к возникновению антиинтронов. Поэтому нет и явления, подобного сплайсосомным интронам, из антиинтронов возникшим.

Самонаводящиеся эндонуклеазы. Ферменты с таким названием, кодируемые ORF интеинов, многих интронов группы I и некоторых интронов группы II, сообщающие им свойство мобильности, были описаны выше. Механизм действия этого белка показан на рис Рис 5-42. Самонаводящаяся эндонуклеаза с высокой специфичностью распознаёт определённые участки двухцепочечной ДНК и, совершая двусторонний надрез, рассекает их надвое. Затем хозяйская система репарации ДНК залечивает разрыв, используя гомологичный ген в качестве шаблона. Тем самым, если шаблон содержит интрон, копия его переносится в новый сайт. Происхождение самонаводящихся эндонуклеаз и сообщаемого ими механизма мобильности может быть понято, если предположить, что интроны группы I размножились в больших количествах в МІС-геноме предка эукариотов, и для их удаления в процессе эволюции были выработаны специализированные ферменты, обнаруживающие интрон в двухцепочечной РНК, иссекающие его и сращивающие образующиеся концы. Можно предположить, что размножение интронов группы I в двухцепочечной РНК имело массовый характер, и в результате появилось несколько семейств ферментов описываемого типа, интроны удаляющих. Все эти ферменты действовали в интересах хозяина, и потому гены их составляли часть хозяйского генома.

Для объяснения возникновения эффекта самонаведения достаточно предположить, что обсуждаемый фермент сменил направление катализируемой им реакции после замены двухцепочечной РНК на двухцепочечную ДНК (см ниже). Вероятно, фермент изначально связывался с РНК выше и ниже интрона, иссекал интрон и сводил вместе образовавшиеся концы. Теперь тот же фермент обнаруживал последовательность ДНК, идентичную или гомологичную состыкованным концам, и рассекал её надвое. Небольших изменений в термодинамике фосфодиэфирных связей, вызванных заменой РНК на ДНК, оказалось достаточно для смены направления катализируемой реакции. Если при этом ген описываемого фермента случайно помещался внутри того интрона, который изначально фермент должен был иссекать, то возникшая ассоциация фермента и интрона оказывалась устойчивой и мобильной. Смена РНК на ДНК, таким образом, привела к смене направления катализируемой реакции для целого семейства ферментов, иссекавших интроны по сходному механизму, и к преобразованию его в семейство самонаводящихся эндонуклеаз. При этом филогенетические истории эндонуклеаз и мобилизуемых ими интронов не были связаны (что и наблюдается).

В ходе дальнейшей эволюции наибольшего успеха достигли те интроны и интеины, самонаводящиеся эндонуклеазы которых позволяли им внедряться как в гены вирусов (и фагов), так и в гены хозяев. Тем самым интроны обретали способность размножаться в геноме клетки и перемещаться от одной клетки к другой. Поэтому наибольший успех должен был сопутствовать эндонуклеазам, распознающим и специфически связывающимся с последовательностями ДНК, присущих и вирусам и хозяйским геномам. Таковыми являются гены белков, непосредственно участвующих в метаболизме ДНК. При этом имело смысл связываться с наиболее консервативными участками генов, поскольку этим обеспечивалась наибольшая универсальность эндонуклеаз. Наибольшую консервативность, как хорошо известно, обнаруживают активные центры ферментов и

сайты связывания их с субстратом. Этим, видимо, и объясняется тот факт, что содержащиеся самонаводящиеся эндонуклеазы интроны и интеины, как правило, обнаруживаются в активных центрах и сайтах связывания с субстратом ферментов, участвующих в метаболизме ДНК. Далее, способность интрона распространиться в геноме хозяина предполагает, что распространение интрона не должно причинять существенного вреда хозяину. Поэтому для эволюционного успеха интрона была важна способность его вовремя осуществить аутосплайсинг. Поскольку наличие (необходимой для сплайсинга) матуразы не могло быть гарантировано при попадании в новую клетку, в ходе последующей эволюции самонаводящаяся эндонуклеаза приобрела также свойства матуразы.

Предлагаемая схема объясняет происхождение всех каталитических активностей самонаводящейся эндонуклеазы и все закономерности, подмеченные для интронов и интеинов, её кодирующих.

Интроны группы II. Аутосплайсинг интронов группы II с образованием лассо (*lariat*), связанного с кодируемым ORF интрона белком IEP, и последующее использование получившегося таким образом рибонуклеопротеина (RNP) для копирования интрона в гомологичный участок другого гена описан выше (см Рис 5-43). Здесь представлена одна из возможных схем возникновения RNP, в которой полагается, что первоначально этот белок представлял собой матуразу, а затем использовался для удаления антиинтронов группы II.

Напомним, в исходных положениях мы постулируем наличие у предков бактерий мобильных элементов, подобных плазмидам, которых мы назвали протоплазмидами. Мы постулировали также, что протоплазмиды служили объектом паразитизма для интронов группы II. Жизненный цикл протоплазмид и паразитировавших на них интронов состоял в чередовании транскрипции и обратной транскрипции, как и у их хозяев – предков бактерий. Ни протоплазмиды, ни содержащиеся в них интроны не кодировали собственных полимераз, пользуясь хозяйским аппаратам транскрипции и обратной транскрипции. Однако, будучи паразитом, интрон группы II должен был кодировать собственную матуразу, поскольку мог оказаться в клетке, где отсутствовали условия для аутосплайсинга.

Оказавшись внутри клетки предка эукариота, интроны группы II могли встраиваться путём обратного сплайсинга как в антисмысловые последовательности РНК, так и в кодирующие. В первом случае при этом в молекуле РНК возникал антиинтрон группы II, а во втором – интрон группы II. Интрон должен был покинуть молекулу РНК до начала трансляции, при помощи матуразы осуществив аутосплайсинг. Матураза, кодируемая современным интроном группы II, напоминает, связывается с интроном, способствуя принятию им конформации, подходящей для сплайсинга. После иссечения интрона связь его с матуразой не расторгается, и таким образом образуется рибонуклеопротеин (RNP), состоящий из матуразы и интрона, рис 5-43 (А). Предположим, что в ходе эволюции в ORF интрона случайно был добавлен блок, кодирующий эндонуклеазу. Теперь образующийся после иссечения интрона комплекс RNP мог быть использован для удаления антиинтрона группы II, комплементарного интрону, содержащемуся в RNP. Содержащийся в RNP интрон образовывал уотсон-криковские пары с нуклеотидами соответствующего антиинтрона, эндонуклеаза иссекала антиинтрон, сращивая образующиеся концы и тем самым восстанавливая целостность гена.

Можно предположить, что подобные RNP более или менее успешно удаляли антиинтроны группы II из РНК, однако точность наведения была недостаточной. Поэтому в ходе последующей эволюции в ORF интрона был добавлен участок, кодирующий аминокислотную последовательность, способную распознавать места сплайсинга на границах антиинтрона (т.н. экзоны). Теперь активности RNP позволяли обнаружить

антиинтрон, связаться с участком гена на границе антиинтрона и прецизионно осуществить сплайсинг. На этой стадии RNP функционировал в интересах клетки.

Предположим теперь, что в силу стечения обстоятельств активности RNP интрона были задействованы в ином порядке: домен, ответственный за распознавание участка гена на границе с интроном, обнаружил этот участок в гене, не содержащим антиинтрона и связался с ним. Затем матураза RNP осуществила катализ обратного сплайсинга – привела содержащееся в RNP *лассо* в конфигурацию, в которой собственная каталитическая активность *лассо* обеспечивает осуществление обратного сплайсинга. Тем самым, вместо удаления антиинтрона, имела место вставка ранее удалённого интрона в ген, в котором интрон (или антиинтрон) до того момента отсутствовал. Дальнейшая эволюция интрона могла пойти в интересах самого интрона, способствуя распространению его в геномах.

В ходе последующей эволюции обсуждаемый интрон группы II мог обрести способность осуществить обратный сплайсинг не в РНК, в ДНК, но это не имело бы смысла до тех пор, пока ДНК оставалась одноцепочечной. (Очевидно, одноцепочечная ДНК могла быть только кодирующей, коль скоро трансляция непосредственно с молекулы ДНК осуществляется быть не может. Встраиваясь в кодирующую ДНК интрон не имел шансов совершить аутосплайсинг после транскрипции.) Однако, после возникновения обратной транскриптазы и двухцепочечной ДНК (см. ниже), появилась и цепочка ДНК, комплементарная кодирующей. На этой стадии активности белка, кодируемого в ORF интрона, могли быть модифицированы, интрон обрёл способность встраиваться в одноцепочечную ДНК (например в окрестности репликационной вилки, как то имеет место у некоторых современных интронов группы II). Наконец, к ORF интрона могла быть добавлена последовательность, кодирующая обратную транскриптазу, и, после незначительной модификации активностей, интрон (точнее, соответствующий RNP) обрёл способность атаковать двухцепочечную ДНК так, как это делает большинство современных интронов: распознавать участок гена, не содержащего интрон, связываться с ним, осуществить двусторонний надрез молекулы ДНК, вставить *лассо* в одну из цепей путём обратного сплайсинга, осуществить обратную трансляцию вставленного участка с образованием комплементарного отрезка двухцепочечной ДНК, затем предоставить клеточной системе репарации ДНК завершить вставку синтезированного участка в ген.

Сложный, многоэтапный характер предлагаемой схемы, видимо, служит объяснением разнообразию и вариативности механизмов встраивания современных интронов группы II в геном: одни интроны атакуют одноцепочечную ДНК, другие – двухцепочечную, возможны комбинации обеих стратегий. При этом связь интрона и белка, кодируемого его ORF, не прерывалась на всех этапах. Последнее согласуется с тем фактом, что филогенетические истории интронов группы II и кодируемых их ORF белков совпадают.

Интроны группы I в рибосомной РНК. Размножением интронов, в частности интронов группы I, в в МІС-геноме предка эукариотов может быть объяснено присутствие интронов этого типа в рибосомной РНК (рРНК). Напомним, интроны группы I обнаруживают тенденцию к встраиванию в определённые сайты рРНК, совпадающие с теми, в которых интроны группы I рассекают гены рРНК (см разделы 5.5.3 и 5.6.2). Вероятно, интроны путём обратного сплайсинга встраивались в предпочтительные для них сайты (кодирующей) РНК непосредственно перед её репликацией. Перед следующим раундом репликации интрон мог покинуть сайт, совершив аутосплайсинг. Поэтому сайты рРНК, в которых сейчас обнаруживаются интроны группы I, не были сайтами постоянного присутствия интронов. Позднее, когда имела место смена носителя информации МІС-генома с РНК на ДНК (см ниже), случайно оказавшиеся в генах рРНК интроны группы I были скопированы и перенесены на ДНК-носитель, где они оказались увековечены, поскольку ДНК-копия интрона не имеет каталитической активности, необходимой для совершения аутосплайсинга.

Интроны группы I присутствовали в клетках предков бактерий, чей жизненный цикл, напомним, базировался на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, и они тоже могли встраиваться путём обратного сплайсинга в рРНК в момент предшествующий обратной транскрипции. Соответствующий сайт в ДНК тоже не был сайтом постоянного присутствия интрона, поскольку интрон мог покинуть молекулу РНК перед следующим раундом обратной транскрипции. Интроны, случайно оказавшиеся в рРНК предков бактерий при смене их жизненного цикла, когда чередование транскрипции и обратной транскрипции сменилось комбинацией репликации ДНК и транскрипции, оказались «заперты» в молекулах ДНК.

Поскольку концентрация интронов группы I в цитоплазме предков бактерий не была столь высокой, то и встречаемость этих интронов в генах рРНК современных бактерий намного ниже, чем у эукариотов (где они присутствуют и в ядерных геномах, и в геномах органелл). Ввиду отсутствия интронов группы I у предков архей, в генах рРНК современных архей интронов нет.

Возникновение ядра. Многие мобильные генетические элементы, обитающие в современных клетках, такие как вирусы, ретротранспозоны, интроны группы II и многие другие, кодируют собственные полимеразы. Вероятно, полимеразы были ими позаимствованы у своих хозяев, а сами мобильные элементы возникли задолго до появления полимераз. В древности их жизненные циклы, вероятно, мало отличались от циклов хозяев, и копирование их геномов осуществлялось стемпингом хозяйского апатита. Вместе с хозяевами они должны были пройти стадии миниатюризации основы и приспособиться к использованию *bona fide* полимераз. Возникновение ядра у эукариотов может быть объяснено, если предположить, что предки эукариотов служили объектом паразитизма для мобильных генетических элементов, подобно вирусам способным проникать сквозь клеточные мембраны, но использующие хозяйские полимеразы и хозяйский апатит для копирования своих геномов.

Паразиты, чей жизненный цикл был замкнут на использование хозяйских приспособлений для полимеризации, были, вероятно, особенно обременительны для предков эукариотов, копировавших два генома в одной клетке и предоставлявших особенно широкий спектр возможностей для паразитизма. Для защиты от паразитов, области клетки, в которых осуществлялись репликация РНК, транскрипция и обратная транскрипция, могли быть отделены от остального внутриклеточного пространства дополнительным слоем мембраны. Молекулярные приспособления, используемые паразитами для проникновения внутрь клеток, были одноразового действия, как у современных вирусов. Преодолев одну перегородку – клеточную мембрану, оказавшийся внутри клетки вирус не мог преодолеть второй преграды – ядерной стенки, и потому не был в состоянии размножиться.

Наличие ядерной мембраны, вероятно, служило надёжной защитой от паразитов в течение времени, которое потребовалось для нахождения ими путей проникновения сквозь ядерную мембрану или для обзаведения собственной полимеразой. Вопрос о том, были ли МИС- и МАС-геномы на тот момент пространственно разделены, не может быть угадан из общих соображений, поэтому число типов ядер, возникших у предка эукариотов, остаётся неизвестным. Если обработка наследственной информации двух геномов осуществлялась в различных частях клетки, то для предка эукариотов должен был быть характерен ядерный диморфизм, как у современных инфузорий.

Тот факт, что репликация ДНК и трансляция у современных эукариотов осуществляется в ядре, а трансляция, по большей части, вне ядра, наводит на мысль, что паразитировавшие на предках эукариотов генетические элементы в обсуждаемый период, возможно, кодировали собственные рибосомы.

Становление системы передачи сигналов. Отсутствие в природе безъядерных эукариотов свидетельствует, что на определённом этапе их эволюции наличие ядерной перегородки стало одним из условий выживания. Предки эукариотов, лишённые ядра или не сумевшие обзавестись им посредством горизонтального переноса генов, видимо, были истреблены паразитами. Созданием ядер были заложены основы компарментализации клетки, невозможной без налаживания системы сигнализации, обеспечивающей правильное взаимодействие компартментов между собой. Защищаясь от вирусов, предки эукариотов были вынуждены создавать систему передачи химических сигналов, регулирующую жизнедеятельность клетки как целого. Эти, вероятно, и было положено начало системе обмена сигналами между компартментами клетки современного эукариота.

Возникновение обратной транскриптазы и ацидокальциосомы. Фермент обратная транскриптаза (RT), ранее обсуждавшийся в разделе 5.4.1, обнаруживается у ретровирусов, ретротранспозонов, интронов группы II и ряда других мобильных генетических элементов, а также у теломеразы. В том же разделе 5.4.1 было упомянуто о невозможности отождествления группы организмов, в которых возникла RT, из одних лишь филогенетических данных. Согласно развиваемой нами схеме, обратная транскрипция имела место у предков бактерий и у предков эукариотов. Поэтому катализирующий обратную транскрипцию фермент мог появиться в одной из этих двух групп. Тот факт, что RT обнаруживает структурное сходство и гомологию с РНК-репликазой (см обсуждение в разделе 5.4.1), отсутствовавшей у предков бактерий, но наличествующей у предков эукариотов, наводит на мысль о возникновении обратной транскриптазы у предков эукариотов. Поэтому мы принимаем допущение о происхождении фермента RT у предков эукариотов. Поскольку эта полимераза создавалась на основе имеющейся (РНК-репликазы), без прохождения стадии миниатюризации апатитового кристалла, описанной в разделе 5.10.1, возникновение RT должно было привести к высвобождению апатитового кристалла, ранее используемого для стемпинга при осуществлении обратной транскрипции. Клеточная органелла, используемая для выращивания апатитового кристалла, была перепрофилирована как приспособление для синтеза и аккумуляции полифосфатов. Таков один из путей возникновения ацидокальциосомы у эукариотов. Другой путь мог состоять в приобретении транскриптазы (ДНК-зависимой РНК полимеразы) путём горизонтального переноса от предков бактерий. Если изначально предки эукариотов транскрипцию ДНК осуществляли стемпингом апатита, то обретение *bona fide* полимеразы, осуществляющей ту же реакцию, могло привести к высвобождению апатитового кристалла и преобразованию его органеллу, подобную ацидокальциосоме.

На следующем витке эволюции RT, вероятно, была заимствована митохондриями, до того момента, подобно всем предкам бактерий, осуществлявших обратную транскрипцию стемпингом апатита. Высвободившиеся апатитовые кристаллы могли дать начало полифосфатным гранулам митохондрий (см раздел 5.9.3). От предков эукариотов фермент RT посредством горизонтального транспорта генов распространился среди предков бактерий. Заимствование RT сопровождалось возникновением волютина бактерий.

Выше (раздел 5.4) высказывалось предположение об использовании каталитической активности апатита для восстановления рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов на ранних стадиях эволюции. Вероятно, предки бактерий и обитавшие в них мобильные формы ДНК использовали этот механизм для синтеза своих ДНК до появления ферментов рибонуклеотидредуктаз. Не исключено, что мобильные формы ДНК продолжали использовать хозяйский апатит для восстановления собственных рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов. С исчезновением апатита из клеток предков бактерий и эукариотов эти мобильные генетические элементы, вероятно, начали кодировать

собственные рибонуклеотидредуктазы, и эта особенность сохранилась у их потомков – ДНК-содержащих вирусов.

Тот факт, что во всех клетках ацидокальциосома обнаруживается в цитоплазме, а не в ядре, вероятно, служит указанием на возникновение ядра уже после появления фермента RT. Если бы к моменту возникновения ядра обратная транскрипция всё ещё осуществлялась стемпингом апатита, ацидокальциосома тоже была бы заключена в ядро.

Возникновение двухцепочечной ДНК. Согласно развиваемой схеме, жизненные циклы предков архей, предков бактерий и предков эукариотов основывались на репликации РНК и чередовании транскрипции с обратной транскрипцией. Между тем копирование наследственной информации у современных клеточных существ базируется на комбинировании репликации ДНК с транскрипцией, а остальные виды жизненных циклов известны только для разнообразных мобильных генетических элементов. Вопрос о том, каким образом более древние способы передачи наследственной информации были трансформированы в цикл, состоящий в комбинировании репликации ДНК и транскрипции, во всей полноте едва ли может быть решён в рамках настоящей работы. Анализ этой проблемы, с привлечением филогенетических данных, нуждается в специальном исследовании. Тем не менее, представляется оправданным высказать некоторые общие соображения о вероятном пути осуществления этой замены и о возможных причинах этого поразительного явления.

Выше было высказано предположение, что ядерная мембрана возникла как преграда на пути мобильных генетических элементов, не кодировавших собственных полимераз. Вероятно, преграда эта была рано или поздно преодолена, и вновь возникла необходимость в защите от паразитов. Двухцепочечная ДНК могла возникнуть как универсальное средство для защиты от одной из групп паразитов, представлявших собой мобильные формы одноцепочечной ДНК.

Напомним, согласно излагаемой нами схеме, фермент RT возникла у предков эукариотов на основе РНК-репликазы. Примечательно, что фермент RT бывает двух типов. RT более распространённого типа обладают активностями РНК-зависимой ДНК полимеразы и ДНК-зависимой ДНК полимеразы, тогда как у менее распространённых активность ДНК-зависимой ДНК полимеразы отсутствует. Более распространённая RT используют одноцепочечную РНК в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной ДНК. Синтез второй цепочки ДНК осуществляется путём присоединения к новообразованной цепи ДНК сравнительно коротких фрагментов, синтезируемых в противоположном направлении, известных как *фрагменты Оказаки*. Предположим, что фрагменты Оказаки первоначально выполняли роль системы распознавания «свой-чужой». То есть предок эукариота, осуществляя обратную транскрипцию, тотчас переводил всю свою новообразованную ДНК в двухцепочечную форму. К одинарной цепочке ДНК, образуемой при обратной транскрипции, по мере её синтеза сразу достраивалась комплементарная ей цепочка ДНК. А всякая ДНК, не являющаяся двухцепочечной, безжалостно уничтожалась. Данная уловка должна была обеспечить эффективную защиту организма от различных форм мобильной ДНК. Для создания такой системы защиты можно было задействовать две полимеразы, действующие в противоположных направлениях.

Далее, с появлением двухцепочечной ДНК появилась и возможность избавиться ещё от двух групп паразитов: от РНК-содержащих вирусов, чей жизненный цикл базировался на репликации РНК (использовавших хозяйский аппарат репликации РНК) и ретровирусов (пользующихся хозяйской RT и(или) соответствующими факторами). Путём модификации нескольких доменов молекулы RT, этот фермент был видоизменён так, чтобы в качестве субстрата использовать ДНК (а не РНК). То есть РНК-зависимая ДНК полимеразы была преобразована в ДНК-зависимую ДНК полимеразу. Наличие частичной гомологии между соответствующими полимеразы (см раздел 5.10) указывает, что такое

преобразование действительно имело место. В результате описываемой трансформации произошла замена носителя наследственной информации в МІС-геноме: с двухцепочечной РНК на двухцепочечную ДНК. Замена репликации РНК на репликацию ДНК позволила заблокировать активности РНК-репликазы и соответствующих факторов, и этим был поставлен заслон на пути вирусов, реплицирующих свою РНК. Далее, новый МАС-геном после спаривания строился на основе ДНК. Это позволило заблокировать обратную транскрипцию, «обескуражив» ретровирусы. Вероятно, непосредственная трансляция ДНК минуя мРНК оказалась невозможной, поэтому процедура транскрипции МАС-ДНК была сохранена. Вирусы, к тому моменту не успевшие ещё обзавестись собственными полимеразами или нуждающиеся в хозяйских факторах при копировании своих геномов, были вынуждены искать новых хозяев.

Смена жизненных циклов. По всей видимости, именно с появлением двухцепочечной ДНК, на некоторое время избавившей предков эукариотов сразу от нескольких групп паразитов, следует соотносить возникновение нового жизненного цикла предка эукариотов, аналогичного жизненному циклу современных инфузорий. Становление этого цикла должно было осуществиться в несколько шагов, но угадать точную последовательность шагов из общих соображений довольно затруднительно. Во-первых, должно было иметь место пространственное разнесение двух геномов. Отныне МІС-ДНК и МАС-ДНК хранились и копировались в разных компартментах клетки. Мы будем их называть, соответственно, *микронуклеусом* и *макронуклеусом*. Кроме того, путём редактирования мейоза возник новый процесс деления микронуклеуса – митоз. Далее, процесс деления макронуклеуса, ранее организованный вокруг чередования транскрипции и обратной транскрипции, был модифицирован. Копирование МАС-генома при делении макронуклеуса теперь заключалось в репликации ДНК, а транскрипция прямого отношения к размножению уже не имела. Главное же отличие нового жизненного цикла от прежнего состояло в укорочении жизненного цикла.

Напомним, ранее наследственная информация в момент предшествующий мейозу осуществлялась по схеме МАС → МІС → МАС. Клетки размножались простым делением, и при этом копировался МАС-геном. Затем, при появлении признаков засорения генома интронами или антиинтронами, клетки прибегали к мейозу для очищения геномов от «маленьких непрошенных гостей». Для этого РНК-копия МАС-генома подвергалась репликации, и так образовывался МІС-геном, используемый в мейозе и спаривании. После спаривания образовывалась одноцепочечная РНК, на основе которой строился МАС-геном новообразованной клетки. С появлением нового жизненного цикла, организованного вокруг репликации ДНК, два генома пространственно обособились. При благоприятных условиях клетки размножались соматическим делением, в котором макронуклеус удваивался путём простого деления, а микронуклеус – путём митоза. В обоих ядрах при этом имела место репликация ДНК-генома. При возникновении неблагоприятной ситуации (внешней или внутренней), клетки прибегали к мейозу и спариванию. При этом в мейозе использовалась МІС-ДНК, перманентно присутствующая в микронуклеусе, а МАС-ДНК утрачивалась. После спаривания образовывалась двухцепочечная ДНК, на основе которой строился новый МАС-геном, далее используемый для трансляции. Тем самым, передача наследственной информации осуществлялась по укороченной схеме МІС → МАС. Во всяком случае, именно по такой схеме осуществляется передача генетической информации у современных инфузорий.

По всей видимости, в течение некоторого времени использование репликации ДНК в качестве универсального средства защиты от многочисленных паразитических форм ДНК и РНК было успешным. Новоявленные эукариоты, подобно гриммовскому Портняжке, *выкроили себе широкие поясы, сшили их и на них большими буквами vyšили: "Единым махом семерых побивахом!"*. Преимущества, предоставляемые новым жизненным циклом, были столь значительны, что посредством горизонтального переноса генов им поспешили

обзавестись предки эукариотов, предки бактерий и предки архей, тем самым сделавшись *bona fide* эукариотами, бактериями и археями. Протоплазмиды предков бактерий, между тем, перешли на репликацию ДНК, подобно своим хозяевам, сделавшись *bona fide* плазмидами. Вирусы, лишившись доступа к прежним хозяевам, устремились в клетки тех, кто не успел или не сумел перейти на новый жизненный цикл. В итоге все такие организмы были истреблены вирусами и фагами, или же они были стёрты с лица земного вследствие конкуренции со стороны более счастливых обладателей двухцепочечной ДНК, неограниченно размножившимся и распространившимися повсюду. Тем самым, возникновение современного жизненного цикла, комбинирующего репликацию ДНК с транскрипцией, было отмечено одним из самых масштабных вымираний в истории планеты.

Миграция генов из органелл в ядро. Изначально жизненный цикл митохондрий и пластид должен был основываться на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, как и у всех предков бактерий. Так же был организован и жизненный цикл протоплазмид, обитавших в органеллах, и интронов группы II, на протоплазмидах паразитировавших. Обе реакции – транскрипция и обратная транскрипция – вероятно, осуществлялись стемпингом апатитовой основы. Впоследствии органеллы, подобно предкам бактерий, перешли на современный жизненный цикл, основанный на репликации ДНК, комбинируемой с транскрипцией, однако в силу каких-то причин этот переход совершился позже, чем у других существ. Этим объясняется тот факт, что ДНК-полимеразы и транскриптазы органелл часто имеют мало общего с ядерными полимеразами их хозяев, [852,853]. Этим же объясняется отсутствие сходства полимераз митохондрии и пластиды с полимеразами, соответственно, риккетсий и сине-зелёных водорослей, потомками которых они, несомненно, являются.

Возможно, переход на новый жизненный цикл для органелл был затруднён, потому что осуществлялся он путём горизонтального переноса генов, т.е. при участии мобильных генетических элементов, а хозяйская клетка предоставляла защиту от таких элементов. Каковы бы ни были точные причины, немедленно заблокировать обратную транскрипцию в органеллах не представлялось возможным. Поэтому задача перехода на репликацию ДНК и транскрипцию для митохондрий, пластид и нуклеоморф была решена другим путём – переносом генов из органеллы в микронуклеус. Впрочем, этим обратная транскрипция была сведена к минимуму, но не упразднена полностью. Некоторые гены не могли быть перенесены в микронуклеус, вероятно, потому что в них присутствовали отклонения от стандартного генетического кода (сохранившиеся поныне). В результате органеллы сохранили фрагменты своих первоначальных геномов. Отметим, содержащиеся в ядерных геномах гены митохондриальных белков отличаются отсутствием интронов. Это показывает, что перенос их в ядро (микронуклеус) был осуществлён уже после упразднения репликации РНК, в полном согласии с предлагаемой здесь схемой. Широкая распространённость использующих полимеразу RT мобильных генетических элементов в митохондриях (таких как ретроплазмиды, интроны группы II) также согласуется с предположением, что обратная транскрипция в органеллах была упразднена позже, нежели в хозяйских макронуклеусах.

Возникновение транспозонов. Имеющиеся сведения о транспозонах могут быть поняты в предположении о происхождении их от мобильных форм одноцепочечной ДНК, обладавших каталитической активностью, т.е. представлявших собой дезоксирибозимы. Возникновение ДНК и жизненных циклов, основанных на чередовании транскрипции и обратной транскрипции, могло привести не только к появлению предков бактерий, но также и мобильных форм ДНК, на предках бактерий паразитировавших или состоявших с ними в отношении взаимовыгодного партнёрства. Можно, например, предположить

наличие у предков бактерий мобильных дезоксирибозимов, принимавших участие в регулировании процессов копирования полинуклеотидов.

Итак, предположим, что современные транспозоны являются потомками мобильных форм одноцепочечной ДНК, обитавших в предках бактерий, с которыми они поддерживали партнёрские отношения, осуществляя регулирование транскрипции и (или) обратной транскрипции. По аналогии с интронами группы I и группы II можно предположить, что эти дезоксирибозимы обладали способностью внедряться в молекулы одноцепочечной ДНК или РНК посредством обратного сплайсинга, и покидать их, осуществляя аутосплайсинг. Будучи мобильной формой ДНК, способной перемещаться не только в пределах генома одной клетки, но и между клетками, транспозон, вероятно, кодировал некий арсенал используемых им факторов, обеспечивавших определённую автономию, поскольку при внедрении транспозона в клетку не могло быть уверенности в наличии всех факторов внутри неё. Кроме того, представляется разумным предположить, что молекулы транспозонов содержали участки, аналогичные регуляторным участкам генов современных эукариотов. С этими участками связывались (кодируемые транспозоном) факторы транскрипции, подобно тому, как факторы транскрипции связываются с регуляторными участками генов современных эукариотов.

В условиях, когда копирование полинуклеотидов осуществлялось стемпингом апатитовой основы, а способность обойтись кристаллом апатита наименьших размеров составляла одно из существенных преимуществ организма, внедрившийся в клетку дезоксирибозим, вероятно, участвовал в регулировании экспрессии не одного гена, а группы генов. Внедряясь вблизи регулируемого гена, затем перемещаясь к следующему, дезоксирибозим использовал способность осуществить обратный сплайсинг и аутосплайсинг для обслуживания многих генов, уменьшая тем самым общее количество регуляторных дезоксирибозимов, что в свою очередь позволяло уменьшить размеры кристалла-основы.

Выше, в разделе 5.2 упоминалось, что древнейшие бактерии являются гипертермофилами (см. Рис 5.2). Продолжая аналогию с интронами, можно предположить, что дезоксирибозимы были способны самопроизвольно осуществлять реакции аутосплайсинга и обратного сплайсинга при повышенной температуре и высоких концентрациях солей, в условиях, типичных для выходов геотерм. По мере освоения предками бактерий новых областей обитания с менее высокой температурой среды или с более низкими концентрациями солей, собственная каталитическая активность дезоксирибозимов оказывалась недостаточной. На этом этапе, вероятно, дезоксирибозимами кодировались белки, подобные матуразам, помогающие осуществить обратный сплайсинг, аутосплайсинг или иные реакции, нужные для их жизнедеятельности. В ходе последующей эволюции матуразы могли быть заменены транспозазами. Место белка, помогающего дезоксирибозиму осуществить ту или иную реакцию, занимал белок, осуществлявший ту же или сходную реакцию без участия каталитической активности ДНК.

После возникновения предков эукариотов, обитавшие в предке бактерии каталитически активные транспозоны, вероятно, вошли в состав новообразованных геномов и, как и ранее, были вовлечены в регулировании процессов, протекающих при участии молекул полинуклеотидов – ДНК или РНК. Помимо регуляции транскрипции и обратной транскрипции, молекулы дезоксирибозимов, вероятно, приняли участие в организации других процессов, протекавших в клетках предков эукариотов, включавших в себя манипуляции с молекулами полинуклеотидов, таких как мейоз и митоз.

В ходе последующей эволюции, после возникновения полимераз, осуществляющих транскрипцию и обратную транскрипцию, отпала необходимость в использовании миниатюрных апатитовых кристаллов. Уменьшение общей длины генома более не составляло фактора выживания. В этих условиях транспозоны, осуществлявшие регуляцию транскрипции и обратной транскрипции, должны были перейти на

индивидуальное обслуживание отдельных генов или небольших групп генов. Общее число транспозонов при этом значительно увеличилось, что позволяло одновременно осуществлять копирование или экспрессию многих генов, как то имеет место в современных организмах. Постепенно такие транспозоны утратили подвижность, поскольку перемещение в геноме более не требовалось для их функционирования. Содержавшиеся в них гены факторов, участвующих в регулировании транскрипции или обратной транскрипции, переместились в другие участки генома. Так, вероятно, и произошли современные факторы транскрипции. Далее, поскольку регулирование (транскрипции того или иного гена например) осуществлялось транспозоном индивидуально, и транспозон непосредственно примыкал к регулируемому гену, регуляторные области транспозонов мало-помалу превратились в регуляторные области (промоторы и энхансеры) соответствующих генов. Этим объясняется обсуждавшийся выше факт связи регуляторных областей многих генов с регуляторными областями транспозонов.

Между тем транспозоны, задействованные в манипуляциях с полинуклеотидами, такими как организация мейоза или образование теломеры, эволюционировали своим порядком. Функции, осуществляемые транспозонами, постепенно перешли к кодируемым транспозонами белкам. Затем и гены этих белков, утратив пространственную связь с транспозонами, переместились в другие сайты генома. Так возникли белки, называемые одомашненными транспозазами. При этом белки, происходящие от родственных транспозаз, оказывались задействованы в сходных или биологически между собой связанных процессах. Этим объясняется феномен, именуемый конвергентным одомашниванием транспозаз. Утратив подвижность, транспозоны, вероятно, исчезли бы полностью. Потому и о связи регуляторных областей генов с транспозонами, как и об одомашнивании транспозаз не было бы известно, если бы транспозоны не активизировались при возникновении двухцепочечной ДНК.

Мобилизация транспозонов с появлением двухцепочечной ДНК. На более ранней стадии эволюции транспозонов, когда они представляли собой мобильные каталитически активные молекулы одноцепочечной ДНК, активность их, вероятно, регулировалась посредством каких-то механизмов, выработанных предками бактерий, в которых эти транспозоны обитали. Те же механизмы могли быть задействованы и на начальной стадии эволюции предков эукариотов, МАС-геном которых по структуре своей был близок к геному предков бактерий. Однако с появлением репликации ДНК могли возникнуть новые механизмы мобильности транспозонов, обеспечивающие перемещение отрезка двухцепочечной ДНК в геноме. Одноцепочечный транспозон, жизненный цикл которого состоял в чередовании транскрипции и обратной транскрипции, мог, например, обзавестись собственным геном обратной транскриптазы, синтезирующей двухцепочечную ДНК по одноцепочечной РНК-матрице и превратиться в современный вариант ретротранспозона.

Ещё один способ обретения подвижности двухцепочечным транспозоном мог состоять в использовании двух транспозаз вместо одной. Если одноцепочечный транспозон, при помощи одной транспозазы перемещавшийся по принципу «вырезать – вставить», становился частью двухцепочечного ДНК-генома, то мобильность его могла быть обеспечена при одновременном участии двух транспозаз. Так, например, мог возникнуть механизм мобильности ДНК-транспозонов *Tc1/mariner*, использующих две идентичные транспозазы, одновременно связывающиеся с транспозоном с противоположных его концов, [949].

Возникновение регуляторной РНК. По всей видимости, к моменту появления двухцепочечной ДНК транспозоны уже утратили (собственную) каталитическую активность, не внедрялись в молекулы путём обратного сплайсинга, поэтому

перестроение жизненных циклов предков эукариотов с заменой репликации РНК на репликацию ДНК не сопровождалось феноменом, подобным описанным выше антиинтроном. Однако некоторые транспозоны к тому времени ещё не утратили мобильности. Можно предположить, что с появлением двухцепочечной ДНК некоторые транспозоны освоили новые механизмы подвижности, посредством которых они перемещались в геноме как отрезки двухцепочечной ДНК. Прежние механизмы контроля активности транспозонов, вероятно, оказались малоприспособлены в контексте двухцепочечных молекул, вследствие чего вновь появившиеся транспозоны размножились в геномах своих хозяев, сделавшись угрозой самому их существованию. Проблема усугублялась многообразием типов транспозонов и необычайным разнообразием кодируемых ими белков. Для спасения эукариотов требовалось создать единый универсальный механизм защиты, позволяющий подавлять активность транспозонов вне зависимости от используемого ими механизма транспозиции. Механизмы RNAi, вероятно, и возникли как ответ на этот вызов.

Известно несколько механизмов подавления экспрессии генов посредством RNAi. Первым из них мог возникнуть тот обсуждавшийся выше механизм, в котором при участии двухцепочечной РНК, а также белков Dicer и Argonaute подавляется трансляция генов. В начале процесса, напомним, фермент Dicer разрезает длинные молекулы двухцепочечной РНК на короткие фрагменты. Отрезок РНК затем приходит во взаимодействие с ферментом Argonaute и другими белками с образованием РНК-белкового комплекса RISC. После образования этого комплекса судьба двух цепочек фрагмента РНК оказывается различной. Кодирующая (т.е. аналогичная разрушаемой мРНК) цепочка отделяется и разрушается, тогда как комплементарная ей цепочка, называемая «направляющей» сохраняется и в дальнейшем используется для связывания RISC с мРНК регулируемого гена за счёт образования уотсон-криковских пар. Затем эндонуклеазная активность входящего в RISC белка Argonaute используется для расщепления мРНК, и тем самым трансляция гена подавляется.

Для объяснения происхождения данного механизма предположим, что неконтролируемое размножение транспозонов в геноме предка эукариотов привело к накоплению мРНК экспрессируемых ими генов в участках цитоплазмы, где молекулы мРНК в норме отсутствовали. Для предотвращения трансляции мРНК транспозонов в таких участках цитоплазмы могли располагаться копии генома, или его фрагментов, в виде одноцепочечных молекул РНК. Молекулы мРНК связывались с комплементарными им участками, и этим трансляция их предотвращалась. Будучи одноразовым, описанный механизм был недостаточно эффективным, поэтому он вскоре был дополнен ферментом, обладающим активностью эндонуклеазы, способным перемещаться вдоль цепочки РНК, обнаруживать двухцепочечные участки, отделять и разрушать вторую цепочку (мРНК), не нарушая исходной цепочки. Такая схема позволяла уничтожать произвольное число молекул мРНК каждого из регулируемых генов. Осуществляющий её белок, вероятно, и был прототипом Argonaute, а исходная цепочка РНК была прототипом «направляющей». Очевидно, более эффективного подавления трансляции ассоциирующихся с транспозонами генов можно было добиться путём переноса комплекса, представляющего собой соединённый с «направляющей» Argonaute, в область, где непосредственно осуществлялась трансляция. Для этого механизм был дополнен эндонуклеазой, которая была способна вырезать небольшие фрагменты двухцепочечной РНК – прототипом Dicer. Argonaute теперь связывался с этим двухцепочечным фрагментом и каким-то образом перемещался в ту область, где осуществляется трансляция. Остальные активности Argonaute остались без изменений. Так мог возникнуть описанный выше современный вариант RNAi.

Отметим, описанная здесь схема возникновения RNAi в принципе могла привести и к появлению механизмов, разрушающих самые гены, а не скопированные с них мРНК, что позволило бы клетке искоренить активные транспозоны, раз и навсегда решив связанные с

ними проблемы. Всего этого не произошло, потому что транспозоны участвовали в регуляции транскрипции и обратной транскрипции, осуществляли разнообразные манипуляции с молекулами ДНК в мейозе, принимали участие в формировании центромеры, обустройстве теломеров и т.п. В интересах организмы было уменьшить активность транспозонов до приемлемого уровня, не сводя её на нет полностью. Более того, поскольку транспозоны сами по себе служили регуляторами или непосредственными участниками многообразных внутриклеточных процессов, механизмы RNAi, возникшие как универсальное средство контроля активности транспозонов, сделались средством регуляции регулируемых или осуществляемых транспозонами процессов. Так механизмы RNAi оказались вовлечены в регулирование экспрессии хозяйских генов. По всей видимости, в ходе последующей эволюции имели место дифференцирование и специализация механизмов RNAi, и в результате образовались две кланды белков Argonaute – Ago и Piwi. Механизмы RNAi, протекающие с участием белков Ago, использовались главным образом для регуляции экспрессии собственных генов организма, а белки Piwi были задействованы, главным образом, в сайленсинге транспозонов. При этом белки Ago главным образом использовались для подавления трансляции регулируемого гена, а белки Piwi принимали участие в регуляции транскрипции генов. Одним из результатов эволюционного совершенствования механизмов, регулирующих транскрипцию, стало возникновение эпигенетической регуляции.

Появление эпигенетической регуляции. В современных организмах эпигенетическое регулирование начинается с метилирования ДНК. Для этого специализированный комплекс RISC рекрутирует фермент ДНК-метилтрансферазу, а содержащаяся в RISC «наводящая» РНК используется для идентификации регулируемого гена. Предположим, изначально этот механизм RNAi использовался для сайленсинга транспозонов. По всей видимости, метилированию подлежали регуляторные области транспозонов, и этим подавлялась транскрипция генов белков, осуществляющих транспозицию. Выше было высказано предположение, что цис-регуляторные элементы современных геномов представляют собой остатки транспозонов, некогда регулировавших экспрессию тех же генов. В согласии с этим предположением, механизм сайленсинга, состоящий в метилировании регуляторных областей транспозонов, создавал предпосылки для возникновения механизма экспрессии собственных генов организма. Для этого достаточно было перенести метилирование с регуляторных областей транспозонов на сходные с ними регуляторные области собственных генов.

Перенос механизмов метилирования регуляторных областей с транспозонов на собственные гены мог в дальнейшем привести к возникновению механизмов регуляции, в которых экспрессия тех или иных генов организма избирательно и целенаправленно подавлялась в ответ на внешние стимулы. В этом возникший механизм был подобен другим механизмам RNAi. Важная его отличительная особенность заключалась в возможности наследования. Клетка, оптимизировавшая экспрессию собственных генов, могла передать последующим поколениям информацию о том, какие гены в текущих обстоятельствах подлежат экспрессии, а какие – нет. Для этого достаточно было организовать механизм копирования метильных маркеров при репликации ДНК. Дочерняя клетка тем самым оказывалась в выигрыше, поскольку появлялась на свет подготовленной к жизни в имеющихся условиях и не тратила времени и ресурсов на поиск оптимальных конфигураций. Так, скорее всего, и возник механизм переноса эпигенетических маркеров, осуществляемый всеми эукариотами при митотическом делении.

Помимо метилирования, для успешного эпигенетического регулирования экспрессии генов необходимо освоить и деметилирование ДНК. Условия в среде обитания подвержены изменениям. В новых обстоятельствах могла возникнуть необходимость возобновить экспрессию заблокированных генов, удалив метильные маркеры с ДНК

соответствующих регуляторных элементов. Однако задача нахождения генов, подлежащих деметилированию, сообразно обстоятельствам, столь же сложна, как и задача идентификации метилируемых генов. По всей видимости, в ходе эволюции механизм индивидуального деметилирования генов при изменениях в среде обитания был заменён на тотальное деметилирование ДНК, осуществляемое в мейозе. Тем самым мейоз, изначально используемый в качестве средства для репарации РНК, затем для удаления мобильных генетических элементов, после возникновения механизмов эпигенетического регулирования обрёл новое применение. К мейозу прибегали (и прибегают), когда сформировавшаяся эпигенетическая программа входила в противоречие с жизненными реалиями.

Комбинация методичного копирования метильных маркеров при репликации ДНК в процессах митотического деления клеток со столь же методичным деметилированием генома при половом процессе позволяла организмам размножаться (осуществляя митоз) в статических условиях, при успешном функционировании сформировавшейся эпигенетической программы, а при возникновении сбоев вследствие смены условий в среде обитания они, пройдя через мейоз, осуществляли активный поиск новой программы.

Возникновение многоклеточности. Механизмы эпигенетической регуляции, в комбинации с митозом, сохраняющим эпигенетическую программу, и мейозом, эпигенетическую программу стирающим, создали предпосылки к возникновению многоклеточных организмов. Ввиду наличия этих механизмов, экспрессия генов осуществляется по-разному, в зависимости от внешних условий. Предположим, испытав мейоз, клетка размножилась путём митотического деления, и при этом дочерние клетки не рассеялись, а остались на том же месте, образовав колонию. Очевидно, клетки в центре колонии оказываются в условиях, отличных от тех, что на периферии. Различия во внешних стимулах приведут к различиям в экспрессии идентичного набора генов. В этих условиях естественный отбор будет способствовать формулированию эпигенетической программы, обеспечивающей успех колонии как целого. Репродуктивный успех будет способствовать представителям колонии, в которой функции, форма и метаболическая активность клеток оптимизированы сообразно их расположению в колонии, т.е. будет иметь место дифференцировка клеток, составляющая отличительную особенность многоклеточного организма. (Отметим, клетки, составляющие организм, не должны поддерживать физический контакт во всё время жизни. Они могут существовать раздельно, собираясь вместе лишь в определённые фазы жизненного цикла, как то имеет место у слизевиков.)

Перенос регуляторной РНК в дочерний организм при мейозе. Согласно изложенной схеме, на определённой стадии эволюции жизненный цикл эукариотов базировался на комбинировании двух процессов: соматического деления и полового процесса. При половом процессе родительские МАС-геномы утрачивались, и новообразованный МАС-геном давал начало новому МАС-геному дочернего организма (во всяком случае, именно так организованы жизненные циклы современных инфузорий). При соматическом делении, параллельно с копированием полинуклеотидов, осуществлялось и копирование эпигенетической информации путём переноса метильных маркеров на синтезируемые цепочки ДНК. При мейозе и половом процессе эпигенетическая информация целенаправленно стиралась. Возможность перезапуска эпигенетической программы путём деметилирования ДНК при мейозе составляла грандиозное преимущество, поскольку позволяла предку эукариота многократно расширить диапазон условий, пригодных для обитания. Однако необходимость деметилирования таила в себе и угрозу успешному функционированию организма, потому что эпигенетическое регулирование базировалось на механизмах RNAi, изначально возникших ради сайленсинга транспозонов.

Деметилирование ДНК должно было приводить к мобилизации транспозонов и размножению их в геноме при половом процессе.

По всей видимости, задача подавления излишней активности транспозонов при сохранении деметилирования ДНК в мейозе была решена путём создания ещё одного механизма RNAi, использующего РНК-копию материнского генома в качестве шаблона для выявления транспозонов внедрившихся в дочерний геном. Вероятно, родительский геном транскрибировался до начала мейоза, полученный двусторонний транскрипт (двухцепочечная РНК) разрезался на небольшие фрагменты посредством Dicer, затем в процессе мейоза эта РНК переносилась в дочерний организм, где использовалась для сличения новых нуклеотидных последовательностей со старыми. Использование механизмов RNAi позволило сличить последовательности, обнаружить внедрившиеся транспозоны и удалить их, восстановив целостность генома. В принципе, возможны два пути сличений: в качестве шаблона может быть использован МС- или МАС-геном родительского организма. Рассмотрение масштабных перестроек генома, имеющих место в макронуклеусе современных инфузорий, выполненное в следующем разделе, приводит к выводу, что обе стратегии осуществлялись не практике.

Филогенетические особенности. С появлением механизмов RNAi возникли принципиально новые возможности регулирования экспрессии генов. Практическое освоение этих механизмов должно было многократно упростить и ускорить процессы горизонтального переноса генов. Если клетка тем или иным путём встраивала в свой геном ген белка, оказавшегося вредным, экспрессию его можно было заблокировать или отложить до следующей стадии жизненного цикла, когда тот же белок мог оказаться полезным. Заимствования вредных генов, тем самым, не обязательно сопровождалось гибелью организма.

Овладев механизмами регулирования экспрессии генов, эукариоты, вероятно, пользовались ими для заимствования генов, или даже комбинаций генов, друг у друга, и у современных им бактерий и архей (или представителей иных царств жизни, ныне исчезнувших). Этим может быть объяснён тот подмеченный Евгением Куниным факт, что соотносимые с археями гены эукариотов не составляют части генома какой-либо из современных архей. Собранные по частям, эти гены, в совокупности, никогда и не составляли части единого генома предка архей.

Далее, многократные горизонтальные заимствования генов должны были приводить к совмещению в одном организме генов с различными филогенетическими судьбами, которые затем вместе подвергались эволюционным изменениям, а после вновь могли быть подвергнуты горизонтальному переносу и перетасованы в новых сочетаниях. Ясно, что филогенетический анализ геномов, возникших в описанном процессе, не может быть произведён стандартными методами. Этим, видимо, и объясняется упоминавшийся выше феномен невозможности укоренения филогенетического древа эукариотов.

Защитив себя от паразитов, эукариоты, вероятно, оказались в преимуществе по сравнению с другими организмами. Освоив механизмы RNAi и эпигенетической регуляции, отдельно взятый организм необычайно расширил диапазон условий, в которых он мог комфортно существовать и размножаться. Поэтому эукариоты беспрепятственно эволюционировали в разных направлениях, осваивая различные среды обитания. В этом, вероятно, и состоял феномен, известный как эволюционный *Big Bang*.

Упразднение макронуклеуса. Изначально МС- и МАС-геномы предка эукариота отличались выполняемыми функциями, структурой (типом полинуклеотида) и механизмом копирования наследственной информации. После замены репликация РНК на репликацию ДНК и упразднения обратной транскрипции появилась возможность упростить жизненный цикл, сведя два генома в один. Напомним, хранящийся в макронуклеусе МС-геном представлял собой двухцепочечную ДНК, копируемую

репликацией в мейозе и митозе. Содержащийся в макронуклеусе МАС-геном тоже состоял из ДНК и копировался репликацией в процессе деления макронуклеуса, синхронизированном с митозом. Для упрощения жизненных циклов достаточно было не пересылать новообразованную ДНК из микронуклеуса в макронуклеус после спаривания, а оставить её в микронуклеусе. Причём для организации упрощённого жизненного цикла не нужно было переносить транскрипцию из микронуклеуса в макронуклеус, потому что транскрипция в микронуклеусе уже имела место как часть механизма RNAi. Вероятно, в течение какого-то времени, транскрипция осуществлялась в ядрах обоих типов, затем вся транскрипционная активность была сконцентрирована в микронуклеусе, перенос ДНК из микронуклеуса в макронуклеус прекратился, и сам макронуклеус был утрачен. Так возник жизненный цикл современного эукариота. Возможные причины сохранения двух типов ядер у инфузорий обсуждаются в следующем разделе (здесь и выше упоминание о «переносе» чего бы то ни было из микронуклеуса в макронуклеус – это формальный приём, используемый для упрощения изложения. В действительности макронуклеус образуется трансформацией одной из копий микронуклеуса. Так, по крайней мере, обстоит дело у инфузорий.)

Обоадающий ядрами двух типов эукариот, в принципе, мог утратить не макронуклеус, а микронуклеус. При этом должен был получиться организм, подобный бактерии, неспособный к мейозу и митозу, размножающийся простым делением, но с необычным для бактерий набором генов.

О преимуществах полового размножения. Если изложенная схема возникновения эукариотов верна, то дискуссию о преимуществах полового способа размножения, обеспечивших широкое его распространение среди эукариотов, следует считать результатом недоразумения. Половой процесс является способом размножения лишь для некоторых групп эукариотов, а для всех прочих это не более, чем перезапуск программы эпигенетического регулирования. Вдохновлённые личным опытом, представители одной из выделенных групп необоснованно перенесли на всех эукариотов собственное представление о сексе как о способе размножения.

О возможности обнаружения каталитически-активных транспозонов. Изложенная выше гипотеза о происхождении транспозонов от каталитически активных форм одноцепочечной мобильной ДНК позволяет объяснить большое число фактов, тем не менее гипотеза была бы более убедительной, если бы дезоксирибозимы были обнаружены в живых клетках. В принципе, активные дезоксирибозимы могли сохраниться в геномах гипертермофильных бактерий, по сей день обитающих в тех же условиях, что и их древнейшие предки. Несмотря на то, что (согласно развиваемой схеме) устройство геномов современных бактерий отличается от устройства геномов их предков, древние каталитически активные одноцепочечные транспозоны могли сохраниться в геномах нового образца, внедряясь путём обратного сплайсинга в одноцепочечные участки ДНК, например в окрестности репликационной вилки (такая стратегия описана для некоторых интронов группы II). В этой связи интересно отметить, что необычные транспозоны действительно обнаруживаются в гипертермофильных бактериях, [948]. Вопрос о наличии у них каталитической активности, насколько я могу судить, экспериментально не исследовался.

5.11.3. Краткое обсуждение.

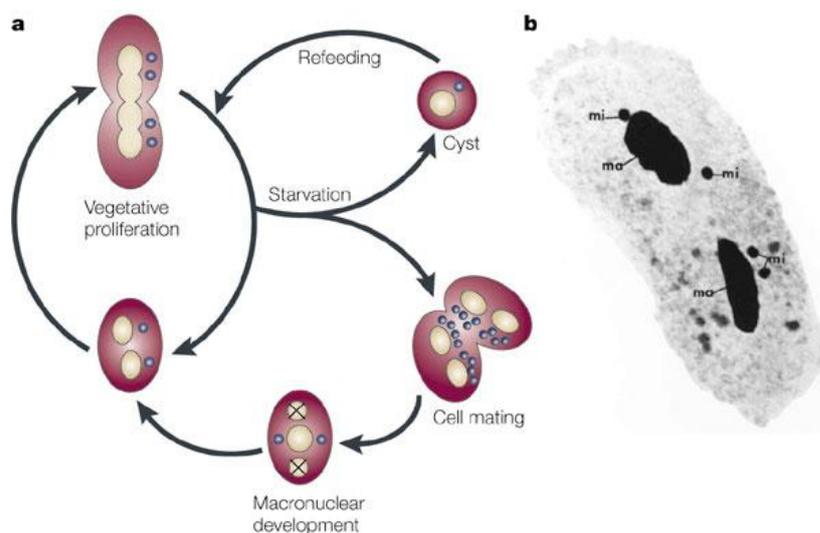
В изложенной схеме возникновения эукариотов получают объяснение все особенности этой группы организмов, заявленные ранее в разделе 5.11.1 как подлежащие объяснению.

5.12. Некоторые особенности цитологии и генетики инфузорий.

В схеме происхождения эукариотов, предложенной в предыдущем разделе, в качестве одной из промежуточных форм фигурирует организм, возникший и существовавший после замены репликации РНК на репликацию ДНК, но прежде утраты макронуклеуса. Это существо, напомним, обладало ядрами двух типов – микронуклеусом и макронуклеусом. Оба ядра содержали двухцепочечную ДНК. В обоих ядрах копирование наследственной информации осуществлялось репликацией ДНК. В общей сложности имело место три процесса деления клеточного ядра: микронуклеус мог делиться посредством митоза и мейоза, а макронуклеус делился посредством некоего более просто организованного процесса, в какой-то мере аналогичного делению бактерий. Трансляции подлежал лишь МАС-геном, а МИС-геном использовался лишь в процессах воспроизведения организмами себе подобных. Транскрипция генома, осуществляемая с целью дальнейшей трансляции образуемой мРНК, должна была иметь место в макронуклеусе. В микронуклеусе или макронуклеусе могло иметь место образование двусторонних транскриптов (двухцепочечной РНК) для последующего использования при регулировании экспрессии генов посредством RNAi. Наличие механизмов RNAi составляло одну из важных особенностей организма. В частности, организм обладал и системой эпигенетической регуляции, включавшей себя метилирование ДНК. Расположение метильных маркеров на ДНК копировалось при соматическом делении клетки, включавшем в себя митотическое деление микронуклеуса и простое деление макронуклеуса – тем самым обеспечивалось сохранение эпигенетической программы. Организм мог осуществить соматическое деление неограниченное число раз, но если эпигенетическая программа начинала давать сбои, имел место мейоз и спаривание, в течение которого прежние макронуклеусы утрачивались, новый микронуклеус образовывался путём мейоза, а на основе одной из копий новообразованного микронуклеуса затем строился новый макронуклеус. При мейозе прежняя эпигенетическая программа стиралась, и таким образом, восстановив свою плюрипотентность, клетка приступала к формулированию новой эпигенетической программы, соответствующей новым жизненным реалиям. Стирание метильных маркеров при мейозе сопровождалось мобилизацией транспозонов. Транспозоны, успевшие внедриться в МИС-ДНК в процессе мейоза, удалялись при помощи специализированного механизма RNAi, в котором копия родительского генома, в виде порезанной на фрагменты двухцепочечной РНК, переправлялась с цитоплазмой в дочерний организм. В дочернем организме родительская РНК использовалась как шаблон для обнаружения и иссечения внедрившихся транспозонов. Весьма примечательно, что имеется класс одноклеточных существ, у которых описаны все перечисленные характеристики – инфузории. Наличие таких организмов служит серьёзным аргументом в поддержку развиваемой схемы возникновения эукариотов. В то же время возникает и вопрос о причинах сохранения их в природе. Тот факт, что, в отличие от прочих эукариотов, инфузории не утратили макронуклеуса, сам по себе нуждается в объяснении. В настоящем разделе, на основании данных о цитологии и геномике инфузорий, сохранение двух геномов у инфузорий объясняется как результат необычных особенностей веригиношения, возникших вследствие амплификации ДНК в макронуклеусе предков инфузорий. В целях амплификации, предки инфузорий фрагментировали свою ДНК перед осуществлением транскрипции. Ввиду необходимости чередования транскрипции с обратной транскрипцией, они, затем, были вынуждены производить масштабные перестройки РНК-генома при осуществлении жизненного цикла. Отражением этих перестроек является известный феномен перестройки ДНК-генома в макронуклеусе современных инфузорий.

5.12.1. Ядерный диморфизм и жизненные циклы инфузорий.

В каждой клетке инфузории обычно обнаруживается два типа ядер – микронуклеус (МИС) и макронуклеус (МАС), Рис. 5-45 (b), различающихся строением и имеющих различные функции. Каждое из ядер содержит полный комплект генов, Содержащуюся в микронуклеусе и макронуклеусе ДНК мы будем обозначать как МИС-ДНК и МАС-ДНК, соответственно. Микронуклеус содержит диплоидный набор хромосом, тогда как макронуклеус является полиплоидным, он также имеет большие размеры. Установлено, что МИС-ДНК используется только как хранилище наследственной информации, а экспрессии подлежат лишь гены, содержащиеся в МАС-ДНК.



Nature Reviews | Genetics

Рис 5-45. Схема образования двух типов ядер, макронуклеуса и микронуклеуса, у инфузории *Oxytricha trifallax*. The behaviour of ciliate nuclei. a | The life cycle of *Oxytricha trifallax* (two macronuclei (cream) and two micronuclei (blue)). When food organisms (usually the alga *Chlorogonium*) are available, ciliates proliferate continuously. Starvation induces cyst formation or cell mating. Only one macronucleus and one micronucleus are retained in a cyst. Dried, frozen cysts remain viable for decades; cysts hatch in water containing food organisms and resume proliferation. In mating, two cells join, undergo meiosis of micronuclei (eight haploid micronuclei are shown in each cell in a mating pair) and exchange haploid micronuclei. A diploid micronucleus is formed by the fusion of two haploid micronuclei. The new diploid micronucleus divides mitotically and one of them develops into a new macronucleus. The unused haploid micronuclei (not shown) and old macronuclei (X's) degenerate. The remaining new diploid micronucleus divides again to give two micronuclei. At the end of development, the macronucleus divides so that the nuclear complement of two macronuclei and two micronuclei is reconstituted. The cells resume proliferation if food is present or otherwise form cysts. b | Light micrograph of *Oxytricha nova*, stained to show the four micronuclei (mi) and the two macronuclei (ma). Из обзора [259].

При наличии избытка пищи инфузории обычно размножаются бесполом путём. При этом микронуклеус делится посредством митоза, а макронуклеус делится в процессе, называемом амитозом (amitosis), природа которого ещё не была детально изучена. Достоверно известно, что процесс деления макронуклеуса не является ни митозом, ни мейозом. Тем самым, бесполое размножение инфузорий включает в себя синхронизированное деление двух типов ядер.

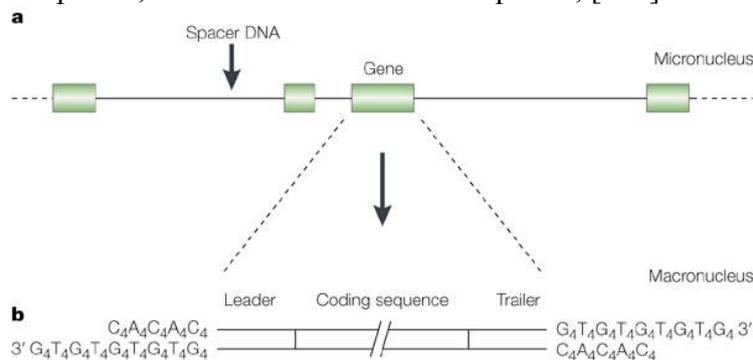
В условиях стресса или при недостатке пищи имеет место т.н. половое размножение инфузорий. Термин «размножение» в данном случае является данью традиции, поскольку число особей до и после спаривания не изменяется. При половом размножении микронуклеус удваивается посредством мейотического деления, содержимое его (т.е. МИС-ДНК) передаётся по наследству, а макронуклеус вместе с содержащейся в нём МАС-ДНК утрачивается. Новый макронуклеус развивается из одной из копий микронуклеуса в

результате достаточно замысловатого процесса, описанного, например, в [260], детали которого для разных видов могут меняться. В качестве примера на Рис. 45(a) показана схема образования микронуклеуса и макронуклеуса в жизненном цикле инфузории *Oxytricha trifallax*.

Поскольку макронуклеус (при половом размножении) развивается из микронуклеуса, и тем самым вторичен по отношению к нему, можно было бы предположить, что и процесс бесполого размножения организован вокруг митотического деления микронуклеуса. В действительности всё обстоит в точности наоборот. Известны примеры бесполого размножения инфузорий с отсутствующим микронуклеусом. Согласно данным, помещённым в монографии [854], в природе иногда обнаруживаются инфузории, вовсе лишённые микронуклеуса. Эти инфузории успешно размножаются в культуре в течение длительных периодов времени. Сходные результаты получены и для инфузорий с удалёнными микронуклеусами. Например, если у инфузории *Paramecium tetraurelia* удалить микропипеткой оба её микронуклеуса, большинство особей погибает, потому что в результате операции они утрачивают способность питаться. Однако некоторые выживают, и после этого они благополучно растут и размножаются во всё время, пока длится эксперимент.

5.12.2. Сопоставление геномов в микронуклеусе и макронуклеусе.

Как уже было упомянуто, микронуклеус инфузорий содержит гаплоидный набор хромосом. Обнаруживаемая в нём МИС-ДНК состоит из гигантских молекул, типичных для хромосом эукариот. Гены, разбросанные по этой ДНК, обычно составляют от 5 до 20% её сложности. Остальное – это главным образом некодирующие участки, иногда называемые спэйсерами (spacer DNA). Отмечается, что МИС-ДНК содержит очень мало интронов, и они все необычайно коротки, [259].



Nature Reviews | Genetics

Рис 5-46. Ciliate genome organization. **a** Arrangement of genes in micronuclear DNA. **b** Excision of a gene and telomere addition during macronuclear development. Из обзора [259].

В противоположность микронуклеусу, макронуклеус характеризуется высоким уровнем полиплоидии, содержащаяся в нём МАС-ДНК используется для транскрипции, с последующей трансляцией. Транскрипции генов в макронуклеусе предшествуют масштабные перестройки генома, сопровождающиеся измельчением хромосом и удалением спейсеров, Рис. 5-46. Каждая предназначенная для транскрипции молекула МАС-ДНК снабжается теломерами и по существу представляет собой миниатюрную ацентрическую хромосому. Масштабы и механизм превращений, осуществляемых в процессе переработки МИС-ДНК в МАС-ДНК могут варьировать для разных классов инфузорий. В детально изученных типах *Tetrahymena* и *Paramecium* молекулы МАС-ДНК содержат многие сотни генов. В отличие от них ДНК инфузорий класса *Oxytricha* измельчается до величины одного гена. В двух родственных типах *Phyllopharyngea* и *Chilodonella* тоже имеет место измельчение генома на отдельные гены, [269]. Некоторые из миниатюрных хромосом МАС-ДНК *Spirotrichea* могут содержать по два или три гена.

При сопоставлении таких хромосом выяснилось, что один и тот же ген может входить в состав разных хромосом макронуклеуса. Явление это получило название *alternative fragmentation*. Отмечается также, что теломеры у миниатюрных хромосом в МАС-ДНК *Oxytricha* все необычайно малой длины, и они принципиальным образом отличаются от таковых в МС-ДНК.

В процессе фрагментирования генома в макронуклеусе может быть выделено три основных стадии. На первой стадии имеет место удаление значительной части некодирующей ДНК, сопровождающееся уменьшением хромосом или разделением их на части. Затем происходит амплификация генома, после которой из генома удаляются небольшие фрагменты – т.н. *internal eliminated sequences* (IESs), [261,262,950].

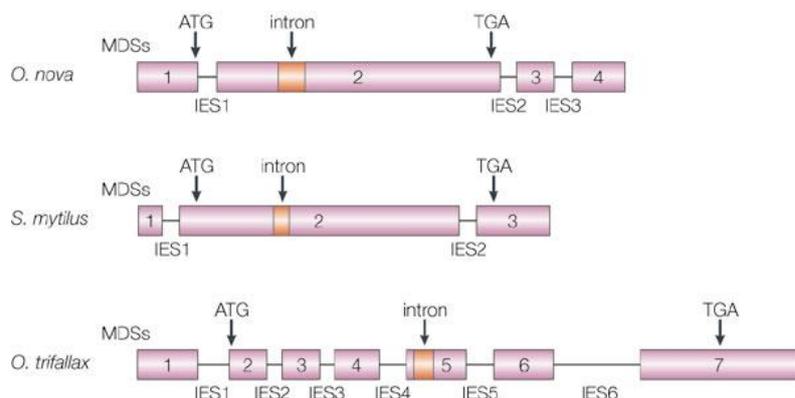
Амплификация генома в макронуклеусе. Феномен амплификации МАС-ДНК заключается в том, что в результате многократной репликации число копий каждой из хромосом может достигать многих сотен или нескольких тысяч. Ранее была распространена точка зрения, согласно которой амплификация генов нужна для быстрого обеспечения растущей клетки всем необходимым. В поддержку этой гипотезы говорит тот факт, что масштабы амплификации генов в инфузориях коррелируют с размерами клетки [267]. Однако авторами [268] было показано, что уровень экспрессии генов в инфузориях не обнаруживает корреляции со степенью их амплификации. Степень амплификации может меняться на порядки при переходе от одного гена к другому, а также при переходе от одной клетки к другой, [266,859]. В определенной мере число копий того или иного гена в МАС регулируется эпигенетическими факторами. Микроинъекции однопечочных РНК-копий генов в макронуклеус материнской клетки увеличивает степень амплификации соответствующего гена в макронуклеусе дочерней клетки. В то же время, уменьшение числа РНК-копий гена в материнском макронуклеусе методами RNAi приводит к уменьшению степени амплификации того же гена в дочернем макронуклеусе [266]. Хотя причины амплификации выяснены не были, не вызывает сомнения, что это явление составляет важную и характерную особенность жизненного цикла инфузорий.

Удаление IESs. Удаляемые после амплификации фрагменты IESs представляют собой короткие богатые (A+T) некодирующие последовательности, как правило, небольшой длины, в 95% случаев не больше 100 пар нуклеотидов. Самый короткий из обнаруженных IESs состоит из пяти пар нуклеотидов, а самый длинный – из 595 пар нуклеотидов. Короткие сегменты IESs не являются кодирующими, и в этом смысле они подобны интронам. Однако, в отличие от интронов, удаляемых из РНК после транскрипции, IESs удаляются непосредственно из ДНК в процессе конверсии МС-ДНК в МАС-ДНК. Общее число IESs, удаляемых из МС-ДНК, варьирует в широких пределах: от 5000 до 6000 в *Tetrahymena* (и это наименьшее из известных значений) до 50000-60000 у *Paramecium*. Удаляемые фрагменты могут быть по-разному распределены в геноме. У *Tetrahymena thermophyla* фрагменты IESs, рассекающие гены, обнаруживаются в промотерах и в интронах. Они не рассекают кодирующих последовательностей, [951]. Для *Paramecium* описано другое распределение удаляемых фрагментов: IESs обнаруживаются в интронах, кодирующих последовательностях и промежутках между генами. Распределение IESs более или менее случайное, при этом 47% генов содержат не менее одного фрагмента IES, [952]. У *Spirotrichea* гены, те что изучены, рассечены во многих местах.

Удаление IESs у *Spirotrichea* может сопровождаться перестановками фрагментов, не подлежащих удалению, а также и сменой полярности. Явление это, получившее название *scrambled genes*, рассматривается ниже более детально, поскольку оно, как мне кажется, проливает свет на причины сохранения ядерного диморфизма у инфузорий.

5.12.3. Фрагментация генов у *Spirotrichea*.

Сличение генов в МАС-ДНК с их прототипами в МИС-ДНК показало, что процесс образования МАС-ДНК у *Spirotrichea* – это нечто большее, чем удаление спейсеров и фрагментов IESs из первоначальной ДНК и присоединение теломеров к образовавшимся «одногенным» молекулам (миниатюрным хромосомам). Напомним, в генах МИС-ДНК обнаруживаются некодирующие последовательности, называемые *internal eliminated segments* (IESs). Подобно спейсерам, сегменты IESs удаляются в процессе развития макронуклеуса. Вставки из IESs разбивают гены в МИС-ДНК на фрагменты, получившие название *macronuclear-destined segments* (MDSs), Рис. 5-47. Данные фрагменты не соответствуют каким-либо доменам в кодируемых ими белках, то есть IESs рассекают гены случайным образом. Каждый сегмент MDS содержит в начале и в конце две одинаковых коротких последовательности из двух-семи пар нуклеотидов, предположительно маркирующих места сплайсинга.



Nature Reviews | Genetics

Рис 5-47. Гены в МИС-ДНК разбиваются некодирующими сегментами *internal eliminated segments* (IESs) на участки, называемые *macronuclear-destined segments* (MDSs, фиолетовые блоки). Сопоставление генов (в данном случае ген кодирующий β -telomere-binding protein) для трёх видов инфузорий, *Oxytricha nova*, *Stylonychia mytilus* и *Oxytricha trifallax* показывает, что после удаления IESs гены в разных видах оказываются идентичными или почти идентичными. Положение интрона (красное) также совпадает в трёх видах. В то же время сегменты IESs в разных видах не обнаруживают сходства ни по составу, ни по длине. /Interruptions in micronuclear genes. Structure of the non-scrambled gene that encodes β -telomere-binding protein in *Oxytricha nova*, *Stylonychia mytilus* and *Oxytricha trifallax*. Internal eliminated segments (IESs) are lines between gene segments called macronuclear-destined segments (MDSs, purple blocks). The intron (red) interrupts the coding sequence at the same codon in all three species. Из обзора [259].

Расположение сегментов IESs в генах из МИС-ДНК, подобное показанному на Рис. 5-47, при котором последовательность сегментов MDSs совпадает с расположением их в гене, полученном после удаления IESs, является характерной, но не единственно возможной. Сличая расположение фрагментов MDSs в генах из МИС-ДНК с расположением тех же фрагментов в генах из МАС-ДНК, Дэвид Прескотт [259] обнаружил, что в ряде случаев фрагменты MDSs в генах МИС-ДНК перепутаны. Именно это явление, получившее название *scrambled genes* вызывает наибольшее недоумение исследователей. Различают два вида скрэмблинга: случайный (*random scrambling*) и закономерный (*nonrandom scrambling*).

Примером случайного скрэмблинга может служить расположение MDSs в гене кодирующем актин I в *Oxytricha nova* и *O. trifallax*. В гене из *O. nova* обнаруживается девять MDSs, переставленных в произвольном порядке 3-4-6-5-7-9-2-1-8, причём сегмент MDS2 инвертирован. Очень похожая картина наблюдается в кодирующем тот же протеин гене из микронуклеуса в *O. trifallax*, однако в последнем общее число сегментов на единицу больше, Рис. 5-48.

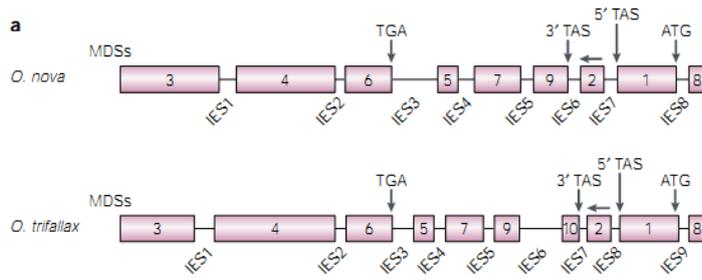


Рис 5-48. Структура спутанных генов кодирующих актин I в *Oxytricha nova* и *Oxytricha trifallax*. Фрагменты Macronuclear-destined segments (MDSs, фиолетовые блоки) переставлены произвольным образом; internal eliminated segments (IESs) показаны линиями соединяющими блоки. Фрагмент MDS2 инвертирован (показано горизонтальной стрелкой) в обоих организмах. (TAS, telomere addition site.) Из обзора [259].

Примерами неслучайного скрэмлинга могут служить гены, кодирующие α -telomere-binding protein и ДНК α -полимеразу. Ген из микронуклеуса *O. Nova* кодирующий α -telomere-binding protein (α TP) разделён тринадцатью вставками IESs на четырнадцать MDSs переставленных замысловатым, но закономерным образом: 1-3-5-7-9-11-2-4-6-8-10-12-13-14. Как можно видеть, первые шесть нечётных MDSs, в правильном порядке, предшествуют шести чётным, а последние три MDSs, 12, 13 и 14, расположены в правильном порядке. Инверсия отсутствует. Сходная перестановки MDSs наблюдаются в кодирующих тот же протеин генах из *O. nova* и *S. Mytilus*, Рис 5-49.

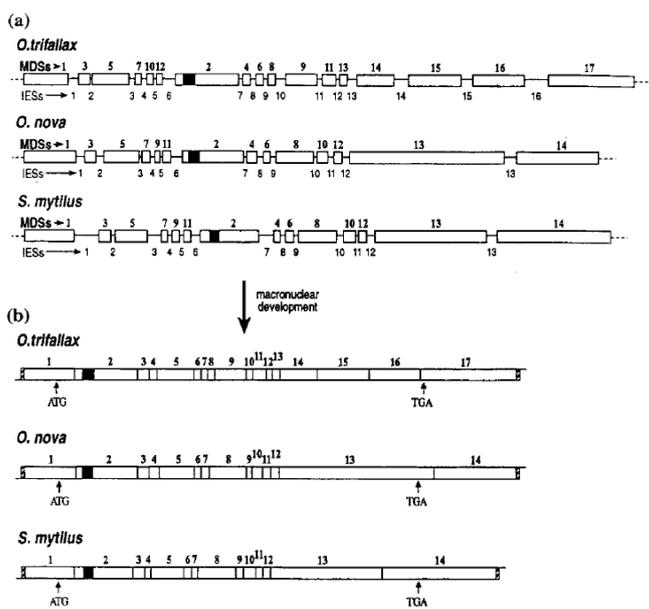


Рис 5-49. (a) Неслучайный скрэмлинг гена кодирующего α -telomere-binding protein в микронуклеусе трёх инфузорий. Сегменты MDSs показаны незалитыми прямоугольниками; номера сверху. Сегменты IESs изображены как линии, соединяющие MDSs; номера снизу. Интроны показаны залитыми прямоугольниками. (b) Те же гены, что и на (a), но в макронуклеусе, после удаления IESs, перестановки MDSs в правильном порядке и сплайсинга. Из обзора [265].

Ещё более замысловатым, неслучайным образом спутаны MDSs в генах кодирующих ДНК α -полимеразу. В микронуклеусе *O. nova* этот ген состоит из 45 MDSs и 44 IESs: 27-26-24-22-20-18-16-14-12-10-8-6-4-1-2-3-5-7-9-11-13-15-17-19-21-23-25-28-30-32-34-36-38-40-42-44-45. Большая часть гена переставлена в порядке чётные/нечётные, как в генах кодирующих α -telomere-binding protein, но при этом в IES, непосредственно предшествующем MDS1, имеет место инверсия, так что MDSs из примерно одной трети

гена оказываются инвертированными по отношению к остальным. Кроме того, в этом гене обнаружилось ещё одно удивительное обстоятельство: исследованный участок МІС-ДНК содержит не весь ген. Отсутствуют восемь фрагментов MDS с нечётными номерами: 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, и 43, составляющие в общей сложности около четверти гена, Рис. 5-50. Несмотря на отсутствие фрагментов, в макронуклеусе обнаружена хромосома, содержащая этот ген целиком, без выпадений.

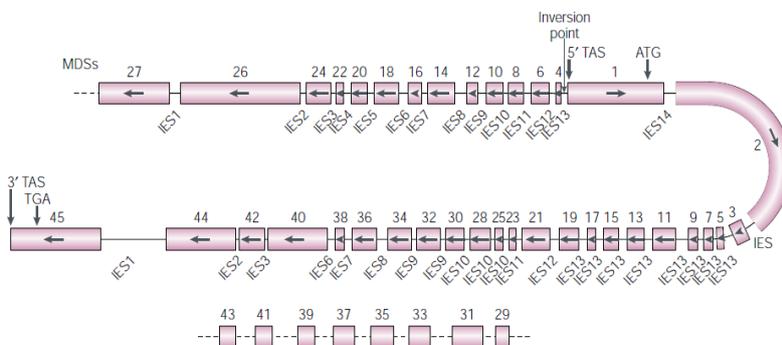


Рис 5-50. Скрэмблинг гена кодирующего ДНК α -полимеразу в инфузории *Oxytricha nova*. Сегменты macronuclear-destined segments (MDSs) показаны фиолетовым, а internal eliminated segments (IESs) – линиями. Стрелки проведены в направлении 5' \rightarrow 3' кодирующей последовательности нуклеотидов. Сегменты MDSs расположены на двух несвязанных участках хромосом в микронуклеусе. Расстояние между MDSs во втором (нижнем) участке неизвестны и потому обозначены пунктиром. (TAS, telomere addition site.)
Из обзора [259].

Расположение фрагментов в гене, кодирующем ту же ДНК α -полимеразу *O. trifallax* сходно с таковым для *O. nova*, но ген разбит на большее число сегментов: 51 MDSs и 50 IESs. Сегменты MDSs переставлены следующим образом: 31-29-27-25-23-21-19-17-15-13-11-0-7-5-1-2-3-4-6-8-10-12-14-16-18-20-22-24-26-28-30-33-35-37-39-41-43-45-47-49-50-51. Сегменты MDSs с номерами 31, 33, 35, 39, 41 и 43 в МІС-гене не обнаружены. Инверсия тоже имеет место в сегменте IES непосредственно предшествующем MDS1.

Связь IESs с транспозонами. Исследовав детали строения концевых последовательностей сегментов IESs в МІС-ДНК инфузорий, авторы [264] пришли к выводу, что IESs представляют собой видоизменённые транспозоны. Впоследствии этот вывод был неоднократно подтверждён по мере секвенирования геномов инфузорий. Связь с транспозонами выражается также и в том, что сплайсинг IESs осуществляется при участии транспозаз.

С наибольшей очевидностью связь с транспозонами прослежена для IESs в МІС-ДНК *Oxytricha trifallax*. Многие из IESs этой инфузории (те, что имеют большую длину) представляют собой ДНК-транспозоны Tc1/mariner из класса TBE (telomere bearing element), [953]. В общей сложности в микронуклеусе содержится несколько тысяч транспозонов, кодирующих активные транспозазы, которые принимают участие в удалении как собственных транспозонов, так и более коротких сегментов IESs, вероятно, представляющих собой деградировавшие транспозоны. В специальных экспериментах, в которых методами RNAi избирательно подавлялась экспрессия отдельных генов, показано, что транспозазы принимают участие не только в иссечении фрагментов IESs, но и в сращивании фрагментов MDSs, [954]. У *Paramecium* и *Tetrahymena* связь IESs с транспозонами выражается в том, что эти фрагменты тоже удаляются транспозазой, гомологичной транспозазе PiggyBac, [955,956]. Однако эта транспозаза кодируется не транспозоном, а единичным геном, присутствующим в МАС-ДНК.

Локализация транспозазы, используемой при удалении IESs из МІС-ДНК *Paramecium* и *Tetrahymena*, в хозяйском геноме указывает на партнёрские взаимоотношения между

транспозоном и населяемым им геномом. Весьма примечательно, что признаки партнёрских взаимоотношений между транспозонами TBE и населяемым ими геномом обнаружены также и у *Oxytricha*. Авторы [270] использовали метод RNAi для решения вопроса о том, используется ли транспозаза, кодируемая IESs в *Oxytricha*, для удаления этих транспозонов из MIC-ДНК. В исследуемой инфузории обнаружено три разновидности транспозонов этого класса. Авторы делали микроинъекции двухцепочечной РНК, гомологичной транспозазам TBEs указанных трёх TBEs, для блокирования их экспрессии. Было обнаружено, что одновременная инъекция РНК всех трёх типов делает невозможным удаление TBEs в MAC-ДНК. Однако инъекции РНК, гомологичной TBE лишь одного или двух типов, почти не сказывается на удалении TBEs всех трёх типов. Тем самым выяснилось, что транспозазы, кодируемые TBEs, действительно принимают участие в удалении TBEs, причём транспозазы, кодируемые одним из TBEs, способны удалять из ДНК «чужие» TBEs. Подобные приспособления, предполагающие глубокие симбиотические взаимоотношения ДНК транспозонов с геномом хозяина, могли возникнуть лишь в результате их длительной совместной эволюции. Природа этого симбиотического партнёрства остаётся загадкой.

Использование механизмов RNAi при удалении IESs. Перенос РНК из материнского организма в дочерний. Удаление сегментов IESs из MIC-ДНК при формировании MAC-ДНК инфузорий осуществляется с использованием механизмов RNAi. Основной принцип состоит в сличении ДНК в макронуклеусе родительского организма с ДНК в формирующемся макронуклеусе потомка. Небольшие отрезки РНК используются в качестве носителей информации о последовательностях ДНК. Обзор современного состояния исследований в данной области имеется в работах [266,957-961]. Ввиду их исключительной сложности, задействованные механизмы ещё не были полностью разгаданы. При этом выявились и принципиальные различия механизмов у трёх модельных организмов. У *Tetrahymena* и, предположительно, у *Paramecium* переносимые отрезки РНК маркируют удаляемую ДНК (IESs), [958], тогда как у *Oxytricha* отрезки РНК маркируют сохраняемую ДНК (MDSs), [266]. Кроме того, у *Tetrahymena* перенос РНК осуществляется от обоих родителей, тогда как у *Paramecium* – только от материнского, [266].

Ещё одно отличие используемых в перестройках генома механизмов RNAi состоит в том, что у *Oxytricha* РНК образуется транскрипцией MAC-ДНК, а у *Tetrahymena* транскрибируется MIC-ДНК. У *Oxytricha* РНК образуется в макронуклеусе родительской клетки на ранней стадии конъюгации посредством двусторонней транскрипции содержащейся в нём MAC-ДНК, [957]. При этом содержащиеся в макронуклеусе миниатюрные хромосомы транскрибируются на всём протяжении от одного теломера до другого, [266]. У *Tetrahymena* молекулы РНК, используемые при удалении сегментов IESs из MIC-ДНК, берут начало в микронуклеусе, где в узкий временной интервал профазы I мейоза имеет место транскрипция, [855,856]. При этом транскрипция является двусторонней, т.е. обе комплементарные цепочки ДНК транскрибируются с образованием двухцепочечной РНК, [857]. Ранее считалось, что двусторонней транскрипции подвергается вся MIC-ДНК, [858], однако в действительности имеет место предпочтительная транскрипция участков MIC-ДНК, содержащих IESs, [959]. При этом образуется и некоторое количество транскриптов с участками, комплементарными MDSs. Затем новообразованная РНК разрезается белком из семейства Dicer на небольшие двухцепочечные молекулы длиной 28-29 нуклеотидов. Полученные отрезки РНК каким-то образом переправляются в материнский макронуклеус, где отрезки РНК, имеющие гомологов в MAC-ДНК, деградируют. В результате остаются только последовательности РНК, гомологичные каким-то сегментам IES. Эти молекулы затем попадают в развивающийся макронуклеус дочернего организма, где они используются для

распознавания и удаления фрагментов IESs при переработке MIC-ДНК в MAC-ДНК, [858].

При всех отличиях между инфузориями разных видов и неполной изученности, сам факт использования инфузориями механизмов RNAi с переносом регуляторной РНК от родителей к потомкам при перестройках генома сомнения не вызывает. Непосредственно продемонстрировано участие в преобразованиях генома таких характерных атрибутов RNAi, как РНК, белки Dicer и Piwi. Для *Oxytricha* также показано, что разметка удаляемой ДНК осуществляется посредством метилирования цитозина, [960], что также составляет один из стандартных атрибутов RNAi.

5.12.4. Фосфатные вакуоли инфузорий.

Инфузории, главным образом *Coleps*, *Euplotes*, *Paramecium*, *Tetrahymena*, часто имеют содержащие фосфаты вакуоли, по своим свойствам очень похожие на ацидокальциосомы апикомплексов и трипаносоматид (см. раздел 5.9.), но не тождественные им, [240]. Подобно ацидокальциосомам, эти вакуоли богаты фосфатами, способны концентрировать кальций и стронций при наличии избытка их в среде обитания, [241], хорошо видны в оптический микроскоп вследствие высокого коэффициента преломления и различимы как области высокой электронной плотности под электронным микроскопом. Как и ацидокальциосомы, они всегда окружены двойной мембраной. Отличает их большее разнообразие форм и состава. Для ацидокальциосом характерны округлые очертания, фосфатные же вакуоли инфузорий могут быть как округлыми, так и угловатыми. Неорганическая составляющая содержимого вакуолей, как и у ацидокальциосом, обычно слагается полифосфатами. Однако в вакуолях встречаются и кристаллические фосфаты, в ацидокальциосоме не обнаруженные, причём кристаллы могут быть разного состава. Органические соединения могут составлять до 50% от массы вакуоли для некоторых видов, [241], и это главным образом фосфолипиды. Содержание серы и азота в них ниже уровня обнаружения (микрозонда), что говорит об отсутствии белков, и это опять-таки сближает их с ацидокальциосомами. К сожалению, данных о наличии ионных насосов в мембране вакуолей, в частности о характерном для ацидокальциосом насосе V-H⁺-Ppase, в литературе найти не удалось.

Из вышеизложенного создаётся впечатление, что фосфатные вакуоли инфузорий представляют собой некое видоизменение ацидокальциосом. Такое предположение представляется вполне правдоподобным, поскольку инфузории филогенетически близки апикомплексам и трипаносоматидам (в которых описаны типичные ацидокальциосомы). Главное отличие фосфатных вакуолей инфузорий от ацидокальциосом, как было упомянуто, заключается в разнообразии слагающих их минеральных частиц. Например, в инфузории *Tetrahymena pyriformis* минеральные частицы имеют вид гранул до 2 мк в диаметре. Первоначально авторы [242, 243] пришли к выводу, что частицы представляют собой смесь пирофосфатов кальция и магния. Последовавшее более детальное исследование с использованием электронного микрозонда и безводных методов приготовления образцов показало, что гранулы представляют собой аморфный полифосфат, а основными катионами являются Ca²⁺, Mg²⁺ и K⁺, [244]. Похожие гранулы были описаны в *Blepharisma japonicum*, [245], но более мелкие, и в них обнаружен лишь аморфный фосфат кальция, предположительно полифосфат.

Фосфатные гранулы в инфузории *Paramecium tetraurelia*, как оказалось, заключают в себе кристаллы струвита, (Mg,Ca)NH₄PO₄·6H₂O, [246]. Минерал идентифицирован методами рентгеновской дифракции и энерго-дисперсионного электронного микроанализа. В *Euplotes eurytostomus* гранулы слагаются радиально-лучистыми кристаллическими агрегатами концентрически-зонального строения, [247]. Кристаллическая фаза идентифицирована не была. Для родственного вида *Euplotes vannus* доказано, что гранулы состоят из фосфата кальция, предположительно гидроксилпатита,

[247]. Наиболее детально изучен апатит, содержащийся в фосфатных вакуолях инфузории *Spirostromum ambiguum*.

Присутствие кристаллического апатита в гранулах из вакуолей *S. ambiguum* было показано методами рентгеновской дифракции [248], электронного микронда, энерго-дисперсионного микроанализа и оптической спектрофотометрии, [249,250]. Впервые апатит в вакуолях этой инфузории был описан Фредериком Путаром, [248], в конце 1950-х. Данный исследователь полагал, что минерализация костей позвоночных возникла вследствие модификации какого-то более древнего процесса, осуществлявшегося без участия коллагеновых волокон. Для подтверждения своих идей он систематически занимался поиском апатита в микроорганизмах, не содержащих коллагена. Среди одноклеточных такая способность была им обнаружена лишь у инфузорий.

Согласно Путару, [248], в одной зрелой, нормальной клетке инфузории *S. ambiguum* может содержаться до нескольких тысяч гранул диаметром от 0.5 до 5 μ . Кристаллический характер образований подтверждён рентгенографией: дифрактограмма минеральных частиц из центрифугата раздробленных инфузорий оказалась очень похожа на дифрактограммы измельчённой кости. Интересные особенности внутреннего строения апатитовых гранул были выявлены при исследовании их изображений под электронным микроскопом. К сожалению, опубликованные автором фотографии низкого качества. Описываемые им детали не всегда ясно различимы на предъявленных изображениях.

Согласно Путару, каждая апатитовая гранула в *S. ambiguum* слагается филаментами, Рис. 5-51. В центре гранулы филаменты расположены хаотично, а ближе к периферии ориентируются по радиусу. Изначально филаменты гранул представляют собой очень тонкие образования, состоящие из органического материала. Затем филаменты кальцинируются с образованием апатита. Кальцинирование начинается на периферии гранул; соответственно, филаменты могут быть кальцинированы полностью или только на периферии. Кальцинированные филаменты, которые автор называет *кристаллитами*, подобны нитям, цилиндрической или почти цилиндрической формы, под электронным микроскопом имеют вид полых трубочек. Диаметр этих трубчатых кристаллических объектов составляет примерно 50 Å, [248].



Рис 5-51. Кристаллические гранулы в вакуоли инфузории *Spirostromum ambiguum*. Две крупные гранулы частично кальцинированы на периферии, и мелкая гранула кальцинирована полностью. F – филаменты, IVe – везикулы.
Из [248].

Отметим, кристаллиты, слагающие гранулы в *S. Ambiguum*, конечно не могут быть кристаллами в точном смысле этого слова. Известны два типа полых наностержней сходных размеров, способных, подобно кристаллам, рассеивать рентгеновское излучение с образованием дискретных дифракционных линий: *свитки*, как в асбестах, тонковолокнистых минералах из группы филлосиликатов, и *нанотрубки*, подобные получившим широкою известность углеродным нанотрубкам или открытым позже и не столь широко известным т.н. неорганическим нанотрубкам.

Асбестоподобные фосфаты кальция действительно существуют, но это всегда полифосфаты. Полифосфатные аналоги хризотил-абеста, в которых анион $[\text{SiO}_4]^{4+}$ заменён на $[\text{PO}_4]^{4+}$, были синтезированы в поисках минеральных волокон, неопасных для здоровья человека, [252]. Однако внешний диаметр асбестоподобных волокон-свитков имеет величину порядка 200 Å, что намного больше 50 Å, наблюдаемых в кристаллитах из гранул *S. ambiguum*. Величина диаметра кристаллитов из *S. ambiguum* лежит в диапазоне значений, характерных для металло-оксидных нанотрубок. Например, внешний диаметр одностенных алюмосиликатных и алюмогерманатных нанотрубок варьирует в диапазоне 15-48 Å, [253]. Поскольку дифрактограммы кристаллитов похожи на дифрактограммы гидроксилapatита, [248], и отношение Ca:P в них равно 1.57 ± 0.01 , [249], тоже соответствует гидроксилapatиту (в полифосфатах, напомним, это отношение значительно выше, порядка 1.7), наиболее вероятно, что гранулы в *S. ambiguum* слагаются одно- или двустенными апатитовыми нанотрубками.

Ф. Путар полагал, что кости позвоночных животных возникли вследствие некоего эволюционного видоизменения апатитовых «кристаллитов», обнаруженных им в *S. ambiguum*. Обсуждение этой гипотезы было бы неоправданным отступлением от основной темы настоящей работы, однако нельзя не отметить очевидного сходства процесса образования апатит-содержащих гранул в описании Путара с процессом т.н. первичного кальцинирования хряща позвоночных. Фосфатные вакуоли в *S. Ambiguum* образуются путём слияния большого количества везикул, см (IVe) на Рис. 5-51. Сходные везикулы принимают участие в образовании полифосфатных гранул в упоминавшейся выше инфузории *T. Pyriformis* [241]. В то же время, первичная минерализация хряща, как теперь хорошо известно, тоже происходит в результате выращивания ультрамикроскопических кристаллов апатита в везикулах, отпочковывающихся от определённых областей цитоплазматической мембраны хондроцитов, остеобластов и одонтобластов, [254-258].

5.12.5. Интерпретация.

Эволюционный сценарий, объясняющий изложенные выше особенности инфузорий, может быть предложен, если мысленно возвратиться к обсуждавшейся выше (раздел 5.11.2) стадии развития предков эукариотов, предшествующей возникновению двухцепочечной ДНК. Согласно излагаемой там схеме, до появления двухцепочечной ДНК предки эукариотов обладали двумя геномами, которые мы обозначили как МАС-геном и МАС-геном. МАС-геном воспроизводился чередованием транскрипции и обратной транскрипции при соматическом делении клеток, а копирование МАС-генома осуществлялось репликацией РНК при воспроизведении половым путём. Регулирование экспрессии генов осуществлялось при участии транспозонов, представлявших собой одноцепочечные молекулы ДНК. Различные манипуляции с молекулами ДНК и РНК тоже, вероятно, выполнялись транспозонами. Для объяснения описанных выше особенностей инфузорий достаточно предположить, что предки их практиковали амплификацию ДНК-генома ещё на том этапе эволюции, когда транскрипция осуществлялась стемпингом апатитовой основы.

Вероятно, весь ДНК-геном изначально подвергался амплификации. В условиях, когда транскрипция осуществляется стемпингом апатитовой основы, амплификация должна была привести к многократному усугублению ассоциированных с веригоношением

трудностей: перерасход дефицитных фосфатов, ограниченная подвижность. В значительной мере трудности эти могли быть преодолены, если разрезать ДНК-геном на части, а затем амплифицировать и транскрибировать получившиеся фрагменты по отдельности. Этим решаются сразу две задачи: во-первых, фрагментация позволяет амплифицировать ДНК-геном дифференцированно, так что количество копий каждого фрагмента генома можно регулировать независимо от числа копий остальных частей (как то имеет место у современных инфузорий). Во-вторых, транскрипция фрагментов генома позволяет уменьшить размеры кристаллов, используемых в качестве основы.

Судя по всему, в процессе эволюции фрагментация генома прогрессировала постепенно. Этим может быть объяснён тот факт, что у инфузорий класса *Oligohymenophorea* отдельные молекулы из МАС-ДНК могут содержать многие сотни генов, в то время как для класса *Spirotrichea* (к которому относятся подробно обсуждаемые выше *O. trifallax* и *O. nova*) характерны МАС-ДНК хромосомы, состоящие из одного гена, иногда нескольких генов. Разрезание одноцепочечной ДНК на отдельные гены или группы генов и поштучная их транскрипция позволили предкам инфузорий уменьшить размеры кристаллов основы в тысячи раз. Это, в свою очередь, создало возможности для дальнейшей амплификации некоторых генов. Вероятно, необходимость дальнейшего наращивания степени амплификации отдельных генов привела к освоению новых путей миниатюризации апатитовой основы, при которых самый ген разрезается на части, транскрибируемые по отдельности стемпингом микроскопических кристаллов апатита, а транскрибированные фрагменты затем собираются в мРНК.

Помимо возможностей наращивания амплификации, преимущество схемы транскрипции, включающей фрагментацию отдельных генов, могло состоять в том, что уменьшение застрачиваемых кристаллов ниже определённых пороговых значений приводит к исчезновению в них протяжённых дефектов кристаллической решётки. Отсутствие протяжённых дефектов, таких как дислокации, должно способствовать повышению точности транскрибирования.

В согласии с высказанной при обсуждении эукариотов гипотезой об использовании транспозонов для выполнения различных манипуляций с полинуклеотидами, можно предположить, что укладка молекул ДНК в апатитовую основу при транскрипции ДНК-генома предков инфузорий тоже выполнялась транспозонами. Так мог возникнуть ДНК-геном, состоящий из чередующихся генов или фрагментов генов, укладываемых в основу, и транспозонов, осуществляющих укладку. На обсуждаемой стадии эволюции транспозоны, вероятно, утратили собственную каталитическую активность (т.е. не имели свойств дезоксирибозимов), так что непосредственные манипуляции с молекулами ДНК осуществлялись транспозазами, а сами транспозоны играли роль регуляторных последовательностей. Воспроизведение МАС-генома, напомним, осуществлялось чередованием транскрипции и обратной транскрипции. При обратной транскрипции ДНК-генома возникали молекулы РНК, состоящие из чередующихся участков, комплементарных генам, и участков, комплементарных транспозонам. Впоследствии участки ДНК, соответствующие транспозонам превратились в спейсеры и IESs, а кодирующие участки, т.е. MDSs, остались без изменений.

На обсуждаемой стадии эволюции предков эукариотов, циркуляция наследственной информации должна была осуществляться согласно схеме МАС→МІС→МАС, т.е. РНК-копия МАС-генома подвергалась репликации, и таким образом возникал МІС-геном в виде двухцепочечной РНК. Затем имели место мейоз и спаривания, после чего новый МАС-геном образовывался на основе одной из цепочек нового МІС-генома. Репликация осуществлялась РНК-репликазой и, по всей видимости, геном реплицировался более или менее как единое целое, т.е. число хромосом в МІС-геноме было невелико, как у современных организмов. На следующей стадии эволюции произошла замена носителя наследственной информации в МІС-геноме – с РНК на ДНК, обратная транскрипция была упразднена, а циркуляция наследственной информации стала осуществляться по

укороченной схеме МІС→МАС, как у современных инфузорий: после мейоза и спаривания новый МАС-геном строился на основе нового МІС-генома. При этом транскрипция по-прежнему осуществлялась стемпингом миниатюрной апатитовой основы.

Далее, после появления *bona fide* РНК-полимеразы, когда прочие предки эукариотов окончательно оставили стемпинг, а кристалл апатита, используемый в качестве основы, превратился в ацидокальциосому, предки инфузорий оказались не в состоянии освоить новую технологию транскрипции. Транскрипция ДНК, состоящей из чередующихся транспозонов и участков MDSs, не имела смысла без специального механизма, составляющего мРНК из фрагментов MDSs, а у предков инфузорий этот механизм был организован как часть процедуры, включающей в себя стемпинг. В итоге стемпинг апатитовой основы у предков инфузорий было продолжен.

В ходе последующей эволюции предки инфузорий, подобно предкам прочих эукариотов, обзавелись технологией регулирования экспрессии генов посредством RNAi. Эти механизмы, в частности, были использованы для регулирования активностей транспозонов и транспозаз, задействованных в укладке ДНК в апатитовую основу при транскрипции. Затем, на более поздней стадии, возникли механизмы эпигенетической регуляции, секс стал средством перезапуска эпигенетической программы, и, наконец, возник механизм удаления двухцепочечных транспозонов посредством версии RNAi, в которой РНК родительского организма с цитоплазмой попадает в организм потомка и используется для опознания и иссечения транспозонов, внедрившихся при репликации ДНК. Только на этой стадии у предков инфузорий появилась возможность сменить стемпинг на РНК полимеразы при транскрипции. Механизм иссечения двухцепочечных транспозонов, внедрившихся в ДНК при мейозе, был задействован для иссечения транспозонов (т.е. IESs), присутствовавших в ДНК изначально. Благодаря механизму сличения родительского и дочернего геномов особенность эта не была утрачена. Чья-то РНК полимеразы, возможно от паразитической бактерии, была рекрутирована для транскрипции полученного гена. Так был положен конец застрачиванию.

Изложенная здесь схема возникновения инфузорий объясняет присутствие сегментов IESs в МІС-ДНК, связь IESs с транспозонами, перестройки генома при образовании МАС-ДНК, участие механизмов RNAi в перестройках и перенос РНК из материнского организма в дочерний при сличении родительской МАС-ДНК с дочерней МІС-ДНК в новообразованном макронуклеусе. Схема позволяет также понять, почему, в отличие от других эукариотов, инфузории не утратили ядерный диморфизм. Ядерный диморфизм проистекает из отличий между МІС-ДНК и МАС-ДНК. Единственный мыслимый способ утраты ядерного диморфизма инфузорией мог бы состоять в замене её МІС-ДНК на МАС-ДНК, но это не представляется возможным, поскольку циркуляция наследственной информации осуществляется в направлении МІС→МАС.

Предлагаемая схема объясняет также отличие фосфатных вакуолей инфузорий от стандартных ацидокальциосом. Ацидокальциосомы, напомним, возникли при обретении предками эукариотов *bona fide* полимераз. Клеточная органелла, содержащая используемый в стемпинге апатитовый кристалл, по упразднении стемпинга перепрофилировалась для синтеза полифосфатов, на том этапе эволюции служивших основным энергоносителем. Наличие в фосфатных вакуолях инфузорий кристаллических ортофосфатов, в том числе и апатита, согласуется с представлением о более позднем отказе от стемпинга, на той стадии эволюции, когда полифосфаты уже утратили своё значение как основные энергоносители.

Возможно, самый облик инфузорий, присущая им способность питаться и перемещаться, не меняя формы тела, возникли как приспособление, жизненно необходимое для клетки, гружёной камнями.

Представление о длительном веригиношении у предков инфузорий позволяет объяснить ещё одну особенность генома инфузорий современных – его консервативный

характер. Согласно автору [259], гены, полученные соединением вместе сегментов MDSs (т.е. удалением разделяющих их IESs), в близких видах оказываются почти идентичными. Это тем более удивительно, что сегменты IESs накапливают мутации очень быстро в процессе эволюции, во всяком случае, быстрее интронов. Соответствующие друг другу сегменты IESs в близких видах инфузорий (т.е. сегменты IESs разделяющие аналогичные блоки MDSs двух гомологичных генов) почти никогда не обнаруживают сходства ни по составу, ни по длине. Даже два аллеля гена из MIC-ДНК могут существенно отличаться своими IESs. Консервативный характер генов, как отмечалось выше, мог возникнуть в результате феномена компрессии генов, сопутствующего веригиношению. В разделе 5.7.2 наличие консервативных последовательностей в древнейших генах интерпретируется как возможное проявление этого феномена. Консервативный характер генов инфузорий, отмеченный в [259], охватывает не фрагмент гена, а весь ген целиком, что согласуется с выводом о сравнительно недавней практике веригиношения у инфузорий. Проявлением феномена компрессии генов может быть и упоминавшийся выше факт малого числа интронов у инфузорий и малых размеров интронов.

В рамках предлагаемой схемы возникновения инфузорий может быть объяснено и явление *scrambled genes*.

Возникновение *scrambled genes* у *Oxytricha*. Перестановки сегментов MDSs и случаи инверсии ориентации нуклеотидов, наблюдаемые примерно у 20 или 30% генов в MIC-ДНК инфузорий *Oxytricha*, могли возникнуть на той стадии эволюции, когда их MIC-геном состоял из РНК и воспроизводился репликацией, а их MAC-геном воспроизводился путём чередования транскрипции и обратной транскрипции. Можно предположить, что MIC-геном состоял из нескольких макромолекул подобно ДНК-геномам современных организмов, поскольку он реплицировался РНК-зависимой РНК полимеразой, принцип действия которой сходен с принципом функционирования ДНК-зависимой ДНК полимеразы. Необходимость сочетания раздробленной ДНК-версии MAC-генома, транскрибируемой отдельными сегментами MDSs, с MIC-геномом в виде макромолекул могла привести к возникновению макромолекул ДНК, состоящих из чередующихся транспозонов и отрезков MDSs.

Размеры транскрибируемых фрагментов MDSs определялись геометрическими параметрами апатитового кристалла, используемого в качестве основы. Поскольку эволюция была нацелена на уменьшение таких кристаллов, время от времени возникала ситуация, когда тот или иной сегмент MDS не мог быть размещён в основе из-за его больших размеров. В этом случае MDS дробился на меньшие части посредством размещения в нём дополнительных транспозонов (ставших впоследствии IESs). По всей видимости, распределение участков IESs в гомологичных генах близкородственных видов *Oxytricha* возникло в результате последовательного дробления гена на всё меньшие части. Как можно видеть на Рис 5-47, 5-48, 5-49, 5-50, с увеличением числа фрагментов MDSs размер максимального MDS всегда уменьшается.

Поскольку транспозоны (ставшие впоследствии IESs) транскрипции не подлежали, они, в отличие от MDSs, в основу не укоренялись. Из общих соображений трудно угадать, как в точности должны были осуществляться транскрипция и обратная транскрипция. Можно, например, предположить, что подготавливаемые для транскрипции разъединённые фрагменты MDSs укладывались в основу один под другим, а перед началом обратной транскрипции эти фрагменты соединялись транспозонами, воссоздавая целостность гена. Закономерные перестановки MDSs в генах из MIC-ДНК *Oxytricha* могут быть объяснены ошибками в работе такой системы, когда транспозоны соединяют фрагменты MDSs не подряд, а через одного.

Схема транскрипция гена, в которой сегменты MDS транскрибируются по отдельности, может иметь смысл, только если используемый для стемпинга кристалл имеет поистине микроскопические размеры – скорее всего, это был апатитовый

наностержень или нанотрубка. Вопрос о форме основы не имеет для нас принципиального значения. Для простоты иллюстраций можно предположить, что в качестве основы выступали нанотрубки, т.е. кристаллоподобные образования цилиндрической формы, весь периметр которых слагается одной гранью. Предположим, молекула ДНК, состоящая из чередующихся участков MDS и IES, навивалась на цилиндрический нанокристалл-основу, как показано на Рис 5-52. Стрелки на Рис 5-52 проведены в направлении $3' \rightarrow 5'$. Участки MDS укоренялись в основу, а соединявшие их транспозоны каким-то образом удалялись. Перед обратной транскрипцией укоренённые участки вновь соединялись транспозонами, затем молекула снималась с кристалла, вероятно, посредством растворения кристалла в кислоте. Справа на рисунке показана принципиальная схема соединения MDSs транспозонами. В дальнейшем, при объяснении путей возникновения *scrambled genes* будут использованы подобные схемы, в более ясной форме иллюстрирующие последовательность соединения участков и их ориентацию.

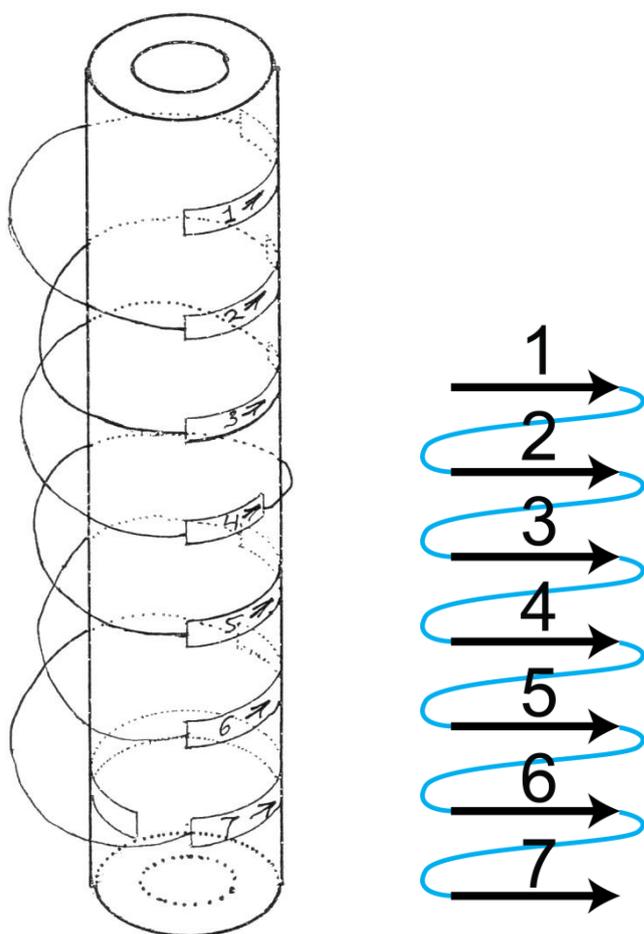


Рис 5-52. Слева: один из возможных способов расположения гена, состоящего из кодирующих участков MDSs и некодирующих транспозонов в основе. Основа для простоты изображена в виде нанотрубки, вся цилиндрическая поверхность которой ограничена единственной гранью. Кодирующие фрагменты MDSs показаны широкими полосками, а разделяющие их транспозоны обозначены тонкими линиями. Фрагменты MDSs пронумерованы, стрелки на них указывают направление $3' \rightarrow 5'$. Фрагменты MDSs укореняются в основу, а соединяющие их транспозоны остаются неукоренёнными. Справа: принципиальная схема соединения фрагментов MDSs транспозонами.

Многообразные перестановки фрагментов MDS, получившие название *scrambled genes*, в том числе и неслучайные перестановки (*nonrandom scrambling*), с инверсией и без оной, могут быть объяснены ошибками, возникающими при соединении правильным образом

расположенных в основе сегментов MDS. Ниже, не развивая общей теории, на двух конкретных примерах поясняется, как это могло произойти. Мы будем говорить о *нормальных* соединениях, если транспозон соединяет 3'-конец одного сегмента MDS с 5'-концом другого сегмента MDS. Соединения будут называться *реверсивными*, если транспозон соединяет два 3'-конца или два 5'-конца.

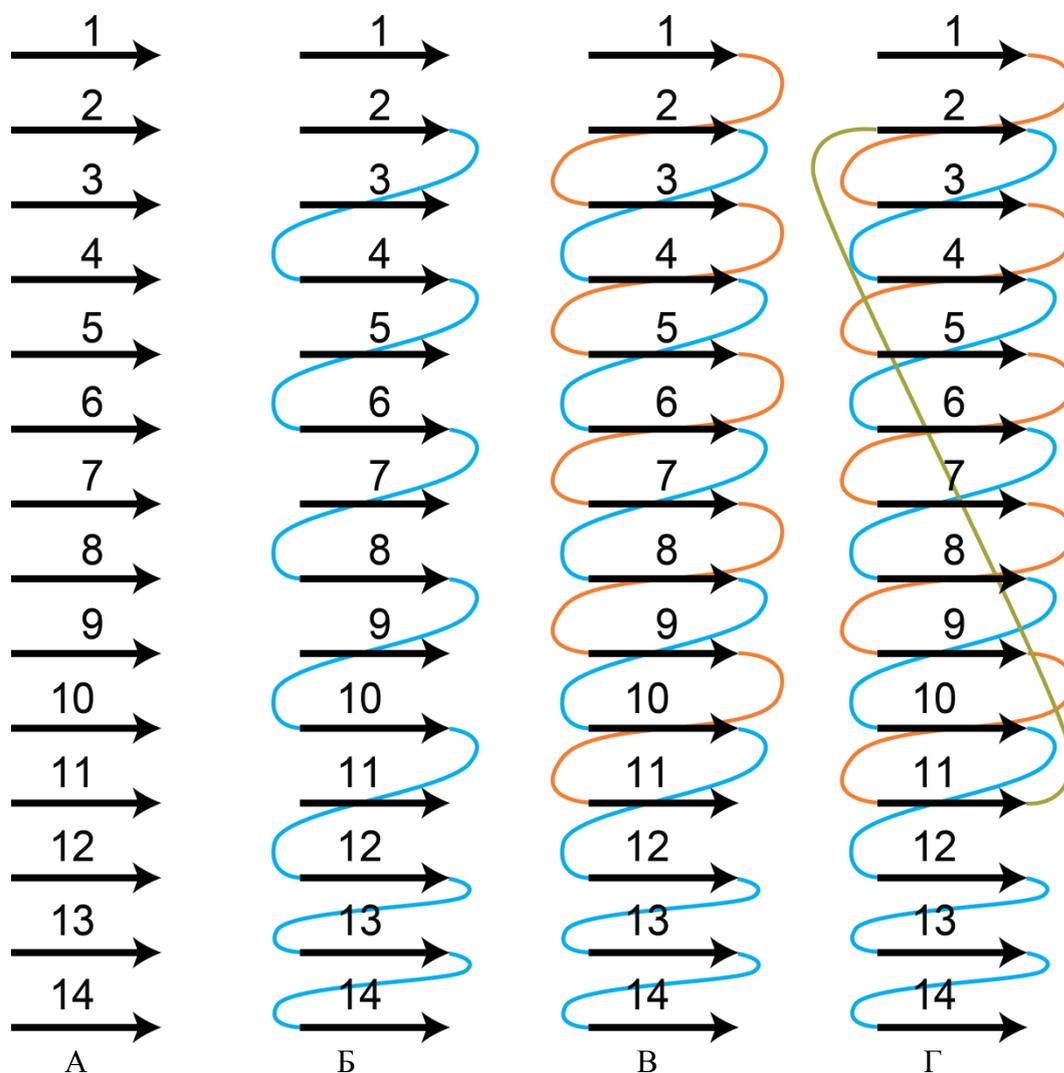


Рис 5-53. Одна из возможных последовательностей шагов, приводящая к неслучайной перестановке сегментов MDSs гена, кодирующего α -telomere-binding protein в *O. Nova*

Рассмотрим последовательность шагов (одну из возможных), приводящих к неслучайной перестановке 1-3-5-7-9-11-2-4-6-8-10-12-13-14 сегментов MDSs, где чётные в правильном порядке следуют за нечетными, а инверсия отсутствует, наблюдаемой в гене кодирующем α -telomere-binding protein в *O. Nova*, показанном на Рис. 5-49. В исходной конфигурации ген разделён на четырнадцать фрагментов MDSs, Рис 5-53(А). Предположим, соединение начинается с нижнего конца, так что сначала фрагменты MDS14, MDS13 и MDS12 правильным образом соединяются подряд, однако затем, в силу каких-то технических неурядиц, имеет место соединение фрагментов с MDS12 до MDS2 через одного, Рис 5-53(Б). Затем имеет место соединение шести фрагментов с MDS1 по MDS11 через одного, Рис 5-53(В). Ген теперь состоит из двух несоединённых отрезков. На заключительном этапе эти отрезки сращиваются подсоединением MDS2 к MDS11, Рис 5-53(Г). После удаления основы расположение MDSs в точности соответствует реально наблюдаемой перестановке, инверсии не возникает, т.к. все соединения являются нормальными.

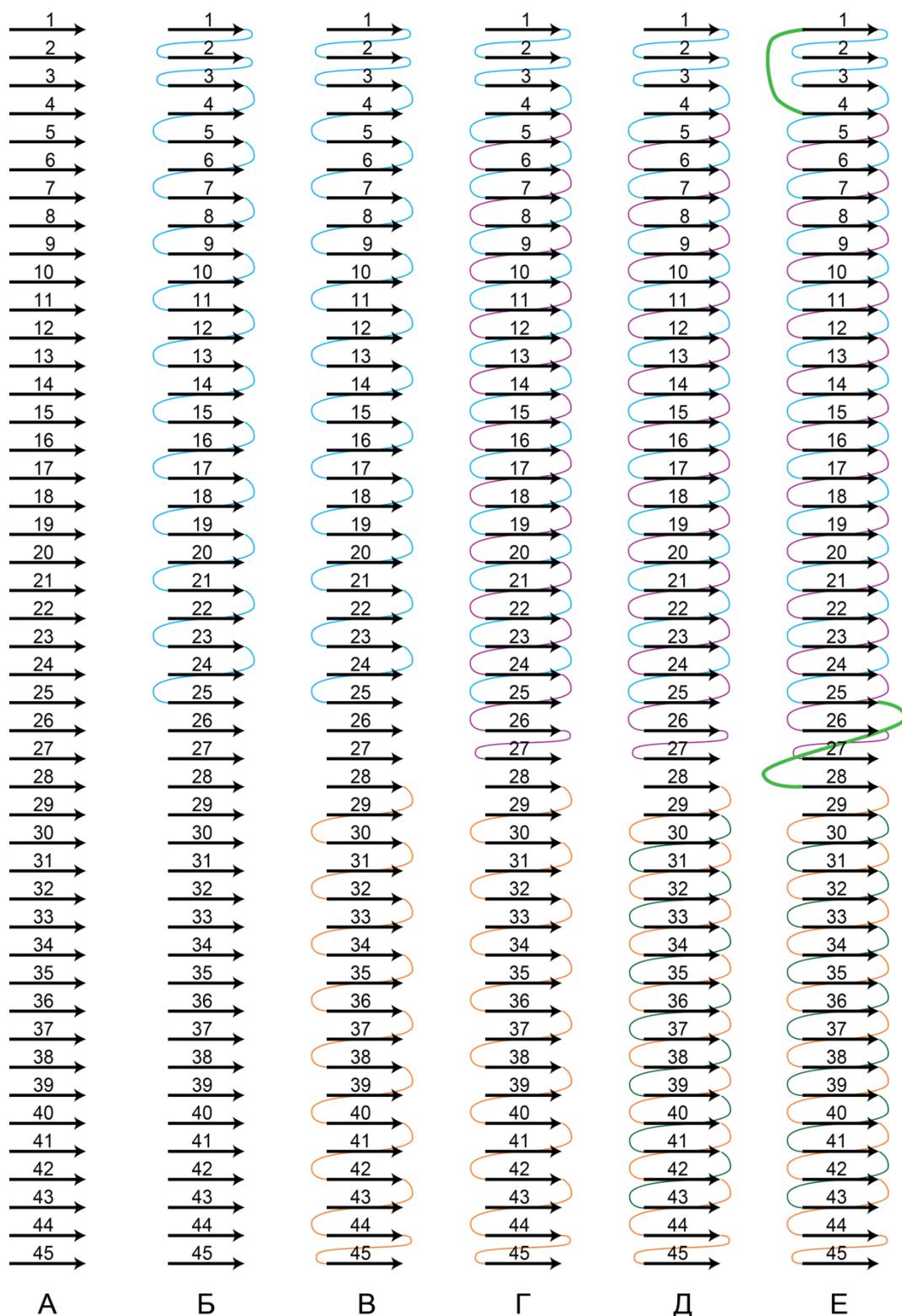


Рис 5-54. Одна из последовательностей шагов, приводящих к неслучайной перестановке 27-26-24-22-20-18-16-14-12-10-8-6-4-1-2-3-5-7-9-11-13-15-17-19-21-23-25-28-30-32-34-36-38-40-42-44-45, обнаруженной в гене, кодирующем ДНК α -полимеразу из микронуклеуса *O. Nova*

Рассмотрим теперь пример последовательности шагов, приводящей к замысловатой и вместе с тем неслучайной перестановке 27-26-24-22-20-18-16-14-12-10-8-6-4-1-2-3-5-7-9-11-13-15-17-19-21-23-25-28-30-32-34-36-38-40-42-44-45, обнаруженной в гене, кодирующем ДНК α -полимеразу из микронуклеуса *O. Nova*, Рис. 5-50. В гене имеет место разделение части фрагментов MDSs на чётные и нечётные, а сегменты с номерами 31, 33,

35, 39, 41 и 43 в MIC-гене не обнаружены. Кроме того, в IES непосредственно предшествующем MDS1 имеет место инверсия.

Наиболее простое объяснение замысловатости перестановки получается в предположении, что имело место одновременное соединение MDSs сразу тремя последовательностями отрезков IESs. Первая последовательность соединений начинается на MDS1. Сегменты MDS1, MDS2 и MDS3 соединяются подряд, а затем вниз через одного до MDS25, Рис 5-54(Б). С противоположного конца в это же время происходит соединение сегментов MDS45 и MDS44 и далее вверх через одного до MDS28, Рис. 5-54(В). Третья последовательность начинается с MDS4 и следует вниз через одного до MDS28, Рис. 5-54(Г). Все три последовательности встречаются примерно посередине гена, и дальнейшее их продвижение оказывается невозможным. На следующем этапе образуются соединения от MDS43 до MDS31 через одного. Ген теперь состоит из четырёх фрагментов, Рис.5-54 (Д). На заключительном этапе образуется нормальное соединение MDS28 с MDS25 и реверсивное соединение MDS1 с MDS4, Рис. 5-54(Е). Ген теперь состоит из двух фрагментов, последовательность MDSs в которых совпадает с показанной на Рис. 50, между MDS1 и MDS4 имеет место инверсия.

Изложенная модель возникновения перестановок и инверсии в генах инфузорий вследствие случайных ошибок при соединении MDSs позволяет объяснить все описанные случаи *scrambled genes*. Мы не станем разбирать здесь оставшихся случаев, так как двух приведённых примеров, мне кажется, достаточно для демонстрации возможности такого объяснения. Отметим лишь, что схемы, объясняющие образование хаотически спутанных генов, таких как гене кодирующем actin I в *O. Nova*, где девять MDSs переставленных в порядке 3-4-6-5-7-9-2-1-8, значительно упрощаются, если предположить, что нанокристаллы основы имели форму тора.

5.13. Заключение.

Основной целью написания данной главы было решение вопроса о возможности согласования гипотезы о стемпинге апатитовой основы как механизме наследования на стадии добиологической эволюции с имеющимися данными о биологической эволюционной истории организмов, их биохимии, молекулярной биологии, палеобиологии, цитологии и генетике. Разумеется, речь на данном этапе, может идти лишь о предварительном анализе ограниченного массива данных, выбранных почти наугад из океана наличествующей информации. Возможно, последующие углублённые исследования, выполненные с привлечением дополнительных сведений, выявят какие-либо существенные противоречия, однако на текущий момент таковых обнаружено не было.

Все предсказания, сделанные на основании нашего постулата о механизме наследования, подтверждены. В частности, вывод о том, что биологическая активность на ранних этапах молекулярной эволюции могла иметь место только вблизи геотермальных источников, поставлявших кристаллы апатита подходящего качества, согласуется с данными филогенетического анализа, согласно которым организмы пяти древнейших таксонов (бактерии *Aquificales* и *Thermotogales*, археи *Nanoarchaeota*, *Pyrodictiaceae* и *Methanopyraceae*) являются гипертермофилами. Феномен веригиношения, предсказанный на основании предлагаемой гипотезы, подтверждается данными палеобиологических исследований. Детали строения предполагаемых окаменелостей древнейших живых существ на земле – апатитовые зёрна, покрытые тонкой графитовой оболочкой, описанные в гнейсах *Akilia*, совпадают с предсказанными особенностями строения веригиносца. В то же время, аномально низкие скорости эволюции указанных пяти древнейших групп, наличие консервативных доменов в древних белках, могли возникнуть как результат связанного с веригиношением феномена компрессии генов. Помимо

перечисленных свидетельств веригиношения, имевшего место на ранних стадиях эволюции, признаки укорочения генома обнаруживаются у инфузорий (малое количество интронов, малые размеры интронов, высокая консервативность генов в их макронуклеусах). Веригиношение инфузорий, имевшее место сравнительно недавно, связано с необычайно длительным использованием этими организмами стемпинга (при транскрипции), что в свою очередь оказывается связанным с амплификацией их ДНК-генома в макронуклеусе. Реликтом веригиношения, по всей видимости, можно считать также и ацидокальциосомы и фосфатные вакуоли эукариотов, волютин бактерий и гранулы митохондрий.

Высказанное предположение, что в условиях, когда апатит используется в качестве устройства для передачи наследственной информации, свойства поверхности этого минерала должны были предопределить набор известных фундаментальных биохимических реакций, тоже, как будто, выдерживает проверку фактами. Ныне известны шесть путей ассимиляции неорганического углерода. Известны десятки молекул, фигурирующих в этих процессах в качестве кофакторов и промежуточных метаболитов. В целом, это вещества различной структуры и химизма. Имеется лишь одно общее свойство присущее им всем – высокое сродство к поверхности апатита, обусловленное присутствием кислотных групп (фосфатных и карбоксильных). Способность же апатита адсорбировать аминокислоты из раствора вкупе со способностью этого минерала катализировать образование пептидной связи обусловила возникновение белков.

Предлагаемая модель возникновения наследственности успешно объясняет происхождение *bona fide* полимераз и рибосомы, функционирующих в современных клетках. Объяснены закономерности строения и особенности частичной гомологии семейства полимераз, форму молекулы которых сравнивают с ладонью правой руки. Кроме того, предлагаемая схема возникновения полимераз позволяет объяснить сходства строения активного центра двух семейств полимераз, структурно и эволюционно между собой не связанных (составные РНК полимеразы и полимеразы в форме пятерни) – в момент катализа активный центр полимеразы есть не что иное как фрагмент структуры апатита. Действие постулированного в предлагаемой нами модели наследования принципа геометрической селекции, наряду с гомологией водородных связей в уотсон-криковских парах обеспечивающей высокий уровень соответствия принципу комплементарности, обнаружено на практике в ныне действующих полимеразах.

Представление о стемпинге как механизме наследования позволяет разъяснить природу и биологическое значение ряда явлений, ранее считавшихся загадочными. В наибольшей степени это касается интронов группы I, для которых выяснено биологическое значение всех катализируемых ими реакций. Способность интронов этой группы катализировать образование фосфодиэфирной связи, вероятно, использовалась при полимеризации нуклеотидов, осуществляемой стемпингом. Объяснение получает тот факт, что, катализируя образование этой связи, интрон группы I сам по себе не мог быть *bona fide* полимеразой, поскольку не обладает способностью контролировать соблюдение принципа комплементарности на уровне, необходимом для сохранения наследственной информации. Соблюдение принципа комплементарности обеспечивается процедурой стемпинга. Выяснено биологическое значение остальных реакций, катализируемых интроном группы I. Получает объяснение и тот факт, что совершить аутосплайсинг без помощи матуразы интрон способен лишь при повышенной температуре, при высоких концентрациях солей цинка или магния, а также при высокой ионной силе раствора. Именно в таких условиях должен был функционировать этот рибозим на стадиях добиологической эволюции, осуществлявшейся, как уже было сказано, вблизи выходов геотермальных источников.

Далее, способность интрона группы I катализировать реакцию, обратную аминокислотилации, и способность его к циклизации собственной молекулы путём лигирования её концов могли быть выработаны как адаптации к функционированию при

повышенных давлениях. Циклизация молекулы предохраняла рибозим от воздействия аминокислот, согласно экспериментальным данным, спонтанно связывающимся с 2'- или 3'-концом молекулы РНК в этих условиях. Способность интрона группы I катализировать реакцию обратную аминоацилированию (т.е. отделение аминокислоты от рибозима) в соединении со способностью его катализировать сплайсинг и обратный сплайсинг, вероятно, была положена в основу молекулярного устройства, функционирующего на поверхности апатита, отсоединявшего аминокислоты от рибозимов. Устройство связывало аминокислоты, объединяя их в полипептиды. При этом была использована (экспериментально подтверждённая) способность апатита к катализу пептидной связи. Общие соображения о том, как могло функционировать подобное устройство, в соединении с принципами, заложенными в модели репликации РНК стемпингом апатита и с экспериментальными данными о химических и каталитических свойствах интрона группы I, тРНК и поверхности апатита позволили предложить модель возникновения трансляции.

В рамках предложенной модели возникновения трансляции получили естественное объяснение такие факты, как ассоциация интронов (разных типов) с генами тРНК, ассоциация интронов группы I с рибосомной РНК, а также тот факт, что фермент тирозил-тРНК-синтетаза митохондрий некоторых организмов, помимо этой активности, является ещё и матуразой интрона группы I. В попытках представить дальнейшую эволюцию нашего гипотетического транслятора возникает модель становления универсального генетического кода, объясняющая вариации стартовых и стоп-кодонов.

Соединение идеи об наследовании, основанном на реакции стемпинга апатита, с имеющимися филогенетическими данными для некоторых полимераз позволяет сделать выводы о происхождении архей от организмов, реплицировавших РНК, а бактерий – от организмов, чередовавших транскрипцию с обратной транскрипцией. Дальнейшее развитие тех же идей позволяет предложить и гипотезу о возникновении эукариотов, в рамках которой получает объяснение большой набор данных, ранее объяснения не имевших. Кроме того, обсуждение явлений, которые могли иметь место при возникновении эукариотов, позволяет объяснить механизм возникновения самонаводящихся эндонуклеаз, кодируемых ORF многих интронов группы I, а также интеинов. При этом получают объяснение и другие закономерности, такие как тенденция кодирующих самонаводящихся эндонуклеазы интронов и интеинов внедряться в консервативные последовательности генов белков, участвующих в синтезе ДНК, или несовпадение филогенетической судьбы интрона (интеина) с филогенетической судьбой кодируемой им эндонуклеазы.

Прояснение вероятных функций интронов группы I позволяет, проведя аналогии, сделать и определённые предположения о происхождении интронов группы II и транспозонов. Развитие аналогии применительно к транспозонам, т.е. представление о транспозонах как о потомках дезоксирибозимов, состоявших в отношениях симбиотического партнёрства с геномами хозяев, позволяет объяснить такие явления, как связь с транспозонами некодирующих областей генов и феномен одомашнивания транспозаз. В качестве логического продолжения этих же построений возникают гипотезы о происхождении механизмов RNAi, происхождении эпигенетической регуляции и о (современном) сексе как о средстве для перезапуска эпигенетической программы. В рамках тех же построений получают объяснение и такие явления, как *retrohoming* у интронов группы II, интеины и сплайсосомные интроны, наличие ядра у эукариотов, ядерный диморфизм инфузорий, перестройки генома инфузорий и участие в них транспозонов. Впечатляющий объём фактов, ранее не получавших объяснения, выводится как следствие единственного постулата – что передача наследственной информации на стадии добиологической эволюции и ранних этапах биологической эволюции осуществлялась стемпингом апатитовой основы. Попутно предлагается сценарий возникновения мейоза, объясняется, как возникла двухцепочечная ДНК, и как был

осуществлѐн переход на современные жизненные циклы, комбинирующие репликацию ДНК с транскрипцией.

Всѐ вышеизложенное позволяет ответить утвердительно на основной вопрос настоящей главы. Представление о стемпинге апатитовой основы как о механизме наследования на стадии добиологической эволюции может быть положено в основу теории происхождения жизни. Тем самым обретает смысл и вопрос об экспериментальном воспроизведении стемпинга.

6. Хемосорбция нуклеиновых кислот апатитом.

Настоящей главой открывается часть книги, целиком посвящённая вопросам практического осуществления абиогенной полимеризации нуклеотидов путём стемпинга апатитовой основы. Вывод, что передача наследственной информации на стадии добиологической эволюции осуществлялась именно этим путём, сделанный в предшествующей главе, подразумевает возможность спонтанного протекания этого процесса при наличии подходящих условий, которые согут быть выяснены из имеющихся экспериментальных данных о свойствах апатита, нуклеотидов, или соединений, являющихся аналогами нуклеотидов.

На начальной стадии стемпинг апатитовой основы включает в себя весьма специфические процессы хемосорбции моно- и полинуклеотидов апатитом, в которых нуклеиновые кислоты помещают свои фосфатные группы в позиции фосфат-анионов на некоторой грани кристалла апатита. В настоящей главе выясняются условия, при которых такая сорбция должна иметь место. Кроме того, в данной главе собраны сведения о влиянии на сорбцию различных факторов, таких как температура, рН и ионная сила раствора, замещения в катионной и анионной подрешётках апатита. Эти данные понадобятся нам в дальнейшем, при обсуждении взаимодействий, имеющих место в последующих стадиях процесса. (Поскольку изменения в составе раствора и модифицирование состава апатита не должны приводить к десорбции нуклеотидов.)

Сродство нуклеиновых кислот к поверхности апатита составляет факт, хорошо известный из практики апатитовой хроматографии. Возникает, тем самым, вопрос о возможности отождествления адсорбции, используемой в хроматографии, с адсорбцией, постулированной нами в описании гипотетического процесса стемпинга. К сожалению, взаимодействие нуклеиновых кислот с апатитом не было изучено с детальностью, позволяющей уверенно судить о механизмах сорбции. Тем не менее, вопрос о природе взаимодействия нуклеотидов с апатитом может быть решён, если рассматривать его как часть более общей задачи – о взаимодействии с апатитом молекул, имеющих кислотные группы: фосфатные, фосфонатные или карбоксильные. Обзор разнообразных исследований о взаимодействии таких молекул с апатитом, выполненных в интересах биохимии, фармакологии и стоматологии, убеждает в общности механизма сорбции.

Сопоставление данных об адсорбции молекул с кислотными группами апатитом позволяет уточнить механизм сорбции, выявить движущие силы этого процесса. Проведённый анализ приводит к выводу, что постулированный нами процесс хемосорбции действительно имеет место, причём не только для нуклеотидов и полинуклеотидов, но и для всего обсуждаемого класса соединений с кислотными группами. Общие закономерности сорбции, выявленные в данной главе, в соединении с данными о поведении нуклеиновых кислот в хроматографической колонке с апатитовым сорбентом и данными о свойствах интерфейса апатит/раствор позволяют достаточно точно указать условия, при которых хемосорбция нуклеотидов будет иметь место, а также условия, при которых будет иметь место десорбция.

6.1. Апатитовая хроматография.

Способность минералов группы апатита сорбировать на своей поверхности биомолекулы различного химизма хорошо известна благодаря успехам гидроксилapatитовой и фторапатитовой хроматографии, используемой для фракционирования белков, эндотоксинов, фосфолипидов и нуклеиновых кислот. Адсорбция гликозаминогликанов гидроксилapatитом тоже была обнаружена и исследовалась с использованием апатитовой хроматографии, [274,275]. Необычайная селективность метода апатитовой хроматографии (открытого случайно в лаборатории Арне Тизелиуса в 1956 г., см. очерк помещённый одним из непосредственных участников, Stellan Hjertén, в *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 45, 1985) традиционно объясняется наличием

центров сорбции двух типов на поверхности минерала, в литературе по хроматографии называемых Р-центрами (P-sites) и С-центрами (C-sites), [276,277], проявляющих противоположные тенденции. Считается, что положительно заряженные частицы, например аминокислоты белков, притягиваются Р-центрами, несущими отрицательный заряд, но отторгаются положительно заряженными С-центрами, в то время как для карбоксильной и фосфатной групп всё обстоит в точности наоборот.

Представления о Р- и С-центрах на поверхности апатита базируются на экспериментальных данных о поведении белков хроматографической колонки с апатитовым сорбентом. Богатые аминокислотными группами щелочные белки удерживаются преимущественно Р-центрами, которые, как полагают, представляют собой протонированные остатки фосфата. Считается, что взаимодействие преимущественно электростатическое. Сорбируемость усиливается при уменьшении pH вследствие увеличения положительного заряда аминокислотных групп. При этом щелочные белки легко могут быть смыты (*eluted*) с сорбента нейтральными растворами электролитов, например NaCl.

Кислотные белки, в противоположность щелочным, взаимодействуют своими карбоксильными и фосфатными группами с С-центрами. Для смыва их требуется фосфат, а NaCl в умеренных концентрациях слабо влияет на удержание. Наиболее отчетливо различия между двумя типами белков проявляются при смыве их хлоридом кальция: кислотные белки не смываются даже 3 М раствором CaCl₂, в то время как щелочные смываются растворами содержащими 0.001-0.003 М CaCl₂. Кроме того, фосфатные группы белков связываются с апатитом прочнее карбоксильных, т.е. для смыва фосфобелков требуются более высокие концентрации фосфатного буфера. Подмечено также, что фосфобелки обнаруживают значительно большее сродство к апатиту, чем их дефосфорилированные аналоги, [278,279].

В 1966 г. Дж. Нанколлас высказал предположение, что С-центры представляют собой атомы Са на поверхности апатитовых кристаллов. Карбоксильные группы сорбируемых молекул, согласно его идее, связываются с поверхностью минерала, образуя хелатные комплексы с этими атомами. Представления Нанколласа о хелатной природе С-центров сделались общепринятыми после появления, в 1984 г., монументального исследования Марины Горбунофф [280-282], изучившей сорбцию 22 белков гидроксилапатитом в хроматографической колонке, заменявшей функциональные группы в белках и смывавшей их растворами, содержащими различные ионы. Выявленные М. Горбунофф закономерности позволили ей сделать вывод об удержании кислотных белков апатитом посредством хелатных комплексов, образуемых карбоксильными группами белков с атомами кальция на поверхности кристаллов. Взаимодействия, приводящие к образованию комплексов, намного сильнее электростатических, и по этой причине кислотные белки не смываются хлоридом натрия. Фосфат образует более прочные комплексы с кальцием чем карбоксильные группы, и поэтому кислотные белки смываются с апатита фосфатом.

Позднее представления М. Горбунофф о взаимодействии карбоксильных групп с апатитом посредством образования хелатных комплексов были перенесены на фосфатные группы. Факт смыва фосфобелков с апатита фосфатным буфером был объяснен конкуренцией между фосфатными группами белков и свободными остатками фосфата в растворе за возможность образовать хелатный комплекс с кальцием, [278]. В 1980-1990х гг. представления о связывании фосфатных и карбоксильных групп белков с апатитом посредством образования хелатных комплексов были перенесены на все содержащие эти функциональные группы соединения сорбируемые апатитом, в том числе и на ДНК. Впрочем, было отмечено, что ДНК связывается с апатитом слабее, чем можно было ожидать для макромолекулы столь обильно фосфорилированной. Цитоплазматическая ДНК, например, смывается при 0.3 М фосфата в растворе, а более мелкие фрагменты ДНК требуют ещё меньших концентраций для смыва, [278,279]. Данное противоречие посчитали

следствием нестыковки пространственного расположения фосфатных остатков ДНК с распределением атомов Са на поверхности кристалла, [277,279].

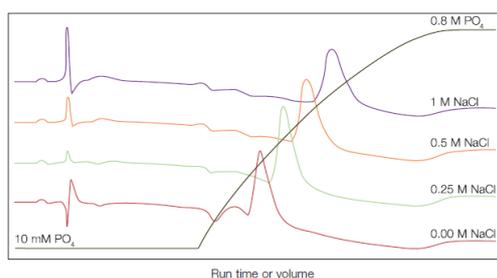


Рис 6-1. Влияние NaCl на смыв ДНК фосфатом с керамического гидроксилapatита в хроматографической колонне. /Elution of sheared salmon sperm DNA from CHT ceramic hydroxyapatite. Data compare the behavior of DNA on CHT as a function of sodium chloride concentration. Increased NaCl concentration improves DNA retention. Из буклета [276].

Ещё одна особенность ДНК в том, что необходимая для её смыва концентрация фосфата значительно возрастает, если в растворе присутствует NaCl, Рис. 6-1. Принято считать, что раствор хлорида натрия экранирует электростатическое отталкивание между остатками фосфата на поверхности кристалла и фосфатными группами ДНК. Хлорид кальция в ещё большей степени способствует удержанию ДНК на апатите, так что при высоких концентрациях CaCl₂ ДНК ничем не может быть смыта с сорбента.

Представления Нанколласа – Горбунофф о роли хелатообразования во взаимодействии кислотных групп с апатитом, базирующиеся всецело на данных хроматографии, не были подкреплены ни спектроскопическими, ни более детальными физико-химическими исследованиями. Они удачно объясняли эмпирические сведения об адсорбции и элюировании белков в адсорбционной колонне с апатитовым сорбентом и благодаря этому получили признание всюду, где используется апатитовая хроматография. В любом современном руководстве по апатитовой хроматографии можно найти описание Р- и С-центров адсорбции, несмотря на то, что за время, прошедшее после публикации работы Марины Горбунофф [280-282], были обнаружены факты, противоречащие этим взглядам. Горбунов, например, не исследовала возможность элюирования кислотных белков сульфатами, полагая это лишним, коль скоро сульфаты не образуют хелатных комплексов с кальцием. В действительности же оказалось, что кислотные белки смываются с апатита не только сульфатом, но и карбонатом, [443,444]. С середины 1990-х всё большее распространение получают альтернативные представления, согласно которым кислотные группы связываются с апатитом за счёт образования ионных связей, вытесняя в раствор его фосфат-анионы. Эта точка зрения основывалась главным образом на данных спектроскопии и калориметрического анализа, полученных при исследовании адсорбции апатитом соединений с кислотными группами, выполненных в интересах фармакологии, биохимии и стоматологии. К сожалению, в этих работах не были учтены имеющиеся сведения о весьма необычной особенности интерфейса апатит/вода – т.н. гидратированном слое. Адсорбционная активность апатита в действительности не может быть понята без учёта свойств гидратированного слоя, к обсуждению которых мы переходим.

6.2. Гидратированный слой апатита (Hydration layer).

Знание физико-химических и структурных особенностей интерфейса вода-апатит составляет одно из необходимых условий правильной интерпретации экспериментальных данных о сорбции молекул апатитом. Успехи апатитовой хроматографии наводят на мысль о наличии у этого интерфейса каких-то необычных свойств. В действительности, вывод о наличии необычного слоя на поверхности апатита был сделан ещё 1950-х гг. Уильямом и Маргарет Нейман (Neuman W.F. и Neuman M.W.), исследовавшими свойства суспензий микрокристаллического апатита. В монографии [284] этими авторами была предложена концепция т.н. гидратированного слоя (*hydration layer*) на поверхности апатитовых кристаллов.

Необычные свойства обнаруживают суспензии тонкодисперсного апатита, характеризующиеся аномально высокой площадью поверхности на единицу массы. В современной литературе этот материал именуется нанокристаллическим апатитом. Согласно Дорожкину [285], приставка *нано* есть выражение духа времени. До 1996 г. этот же материал назывался субмикронным апатитом, микрокристаллическим и т.п. Приготовление его не составляет проблемы (например, смешиванием, в определённой пропорции, водных растворов $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). В некоторых работах объектом исследования служили суспензии мелкодисперсного биоапатита, извлечённого из костной ткани, обнаруживающие сходные свойства.

Первоначально, представления о гидратированном слое базировались на исследованиях динамики перераспределения ионов между водным раствором и суспензией мелкокристаллического апатита методом радиоактивных меток. Так, при добавлении радиоактивных $^{45}\text{Ca}^{2+}$ или ортофосфата с [^{32}P] к буферному солевому раствору, содержащему суспензию гидроксилапатита, в течение первого часа наблюдается быстрое уменьшение радиоактивности раствора, затем спадание радиоактивности продолжается, но в десятки и сотни раз медленнее. У. и М. Нейманы предполагали, что значительная часть ионов в растворе удерживается вблизи поверхности кристаллов в тонком слое раствора, который они называют гидратированным слоем (*the hydration layer*). По этой причине гидратированный слой содержит высокие концентрации ионов, значительно превышающие концентрации одноимённых ионов в основной части раствора (*the bulk solution*), вероятно вследствие сильного электрического поля на поверхности кристалла. Вместе с тем гидратированный слой и основная часть раствора способны быстро обмениваться ионами, а ионообмен между раствором и кристаллическим ядром (*crystal core*) осуществляется намного медленнее.

Исследованиями динамики перераспределения радиоактивных меток между раствором и кристаллами в 1950-х гг. было показано, что при большом количестве кристаллов в суспензии основная масса растворённых ионов оказывается сосредоточена в гидратированном слое. Например, для суспензии, содержащей кристаллы в отношении к раствору 400 mg:200 ml, количество кальция в гидратированном слое в четыре раза превосходит его количество в растворе. Тем не менее, масса кальция в гидратированном слое составляет лишь около 4% от общей массы кальция в кристаллах.

В последующие годы было опубликовано несколько исследований адсорбции пирофосфата, бисфосфонатов и нуклеотидов гидроксилапатитом, выполненных с учётом феномена гидратированного слоя, однако подавляющее большинство исследователей микрокристаллического апатита, как синтезированного, так и биологического, не уделяли этому явлению никакого внимания. В частности, при исследовании адсорбции молекул апатитом большинство авторов оценивают количество адсорбированного вещества из разницы между содержаниями его в исходном растворе и в фильтрате. Такие оценки, очевидно, могут дать лишь суммарное количество молекул, как адсорбированных поверхностью кристалла, так и сконцентрированных в нём в гидратированном слое.

Спектроскопические исследования. Начало современного этапа исследований гидратированного слоя было положено с открытием, в начале 2000-х, т.н. *non-apatitic environments* в ИК Фурье-спектрах нанокристаллического гидроксилapatита. Комбинирование спектроскопических методов с традиционными методами физической химии позволило в значительной мере прояснить природу этого явления. При этом, в свете новых данных, в частности, при сопоставлении спектров нанокристаллического апатита со спектрами других, детально охарактеризованных, ортофосфатов кальция, гидратированный слой предстаёт более сложно организованным образованием, нежели «бесструктурное сгущение ионов», каким его себе представляли исследователи в 1950-х.

Ниже нам понадобятся сведения о некоторых ортофосфатах кальция отличных от апатита. В Таблице 6-1 приведены название, состав, стандартная аббревиатура ортофосфатов кальция, а также растворимость и диапазон pH, в котором они образуются.

Таблица 6-1. Состав и основные свойства ортофосфатов кальция.

Из обзора [285].

Ca/P ionic ratio	Compound	Chemical formula	Solubility at 25 °C, -log(K _s)	Solubility at 25 °C, g/L	pH stability range in aqueous solutions at 25 °C
0.5	Monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	1.14	~18	0.0–2.0
0.5	Monocalcium phosphate anhydrous (MCPA)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.14	~17	[c]
1.0	Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), mineral brushite	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6.59	~0.088	2.0–6.0
1.0	Dicalcium phosphate anhydrous (DCPA), mineral monetite	CaHPO ₄	6.90	~0.048	[c]
1.33	Octacalcium phosphate (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	96.6	~0.0081	5.5–7.0
1.5	α-Tricalcium phosphate (α-TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25.5	~0.0025	[a]
1.5	β-Tricalcium phosphate (β-TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28.9	~0.0005	[a]
1.2–2.2	Amorphous calcium phosphate (ACP)	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O, n = 3–4.5; 15–20% H ₂ O	[b]	[b]	~5–12 [d]
1.5–1.67	Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) ^[e]	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} ^[f] (0 < x < 1)	~85.1	0.0094	6.5–9.5
1.67	Hydroxyapatite (HA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116.8	~0.0003	9.5–12
1.67	Fluorapatite (FA)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	120.0	~0.0002	7–12
2.0	Tetracalcium phosphate (TTCP), mineral hilgenstockite	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	38–44	~0.0007	[a]

[a] These compounds cannot be precipitated from aqueous solutions.

[b] Cannot be measured precisely. However, the following values were found: 25.7 ± 0.1 (pH = 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH = 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH = 5.28).

[c] Stable at temperatures above 100 °C.

[d] Always metastable.

[e] Occasionally, CDHA is named as precipitated HA.

[f] In the case x = 1 (the boundary condition with Ca/P = 1.5), the chemical formula of CDHA looks as follows: Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅(OH).

Многочисленные исследования нанокристаллического апатита, как биогенного, так и синтетического, методами Фурье-ИК-спектроскопии, ЯМР, XANES воспроизводимо показывают наличие особенностей, отсутствующих в спектрах полнокристаллического апатита [286]. В частности, домен ν₄ PO₄ Фурье-ИК-спектров содержит две дополнительные линии, Рис. 6-2, отсутствующие у апатита, которые не могут быть истолкованы как результат какой-либо модификации фосфат-ионов в апатите. Интенсивности этих линий могут быть использованы для измерения относительного количества неапатитовой фазы в образце.

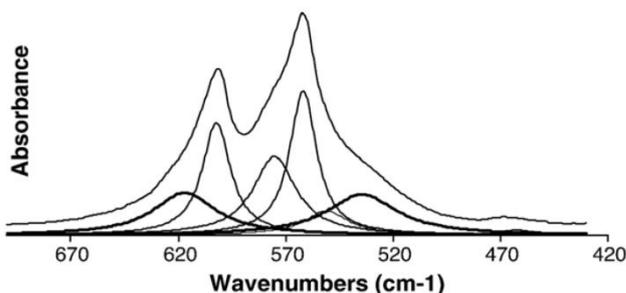


Рис 6-2. Инфракрасные Фурье-спектры нанокристаллического апатита в области $\nu_4 \text{PO}_4$. В дополнение к апатитовым линиям, соответствующим PO_4^{3-} (600, 575 и 560 cm^{-1}) и HPO_4^{2-} (550 cm^{-1}), наблюдаются две полосы поглощения 617 и 534 cm^{-1} , показанные жирными линиями, не связанные с апатитовой структурой. Из работы [286].

Дополнительные линии обнаруживаются также в области $\nu_2 \text{CO}_3$ Фурье-ИК-спектров тонкодисперстного карбонатированного гидроксилapatита, как синтетического, так и биогенного, [286]. Наличие дополнительной фазы не связанной с апатитом было показано для карбонатированного флюорогидроксилapatита методами спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C . В неapatитовой фазе ядра ^{13}C карбоната окружены молекулами воды, тогда как в апатите вблизи карбонат-анионов обнаруживаются гидроксил-ионы (исследовался т.н. карбонатированный апатит типа В, в котором карбонат-ионы замещают позиции фосфата, [286]). В работе [287] исследовался синтетический нанокристаллический фторапатит. Методами спектроскопии ЯМР на ядрах показано наличие протонированных фосфат-анионов (отсутствующих в апатите). Наконец, для синтетического тонкодисперсного гидроксилapatита методами XANES-спектроскопии было показано присутствие ионов Ca^{2+} , ближайшее окружение которых существенным образом отличается от окружения одноимённых ионов в апатите, [288].

Порошковые рентгенограммы нанокристаллического апатита исследовались разными авторами бесчисленное множество раз. Типичная дифрактограмма оказывается идентичной таковой полнокристаллического апатита, с той лишь разницей, что пики уширены, вероятно, вследствие низкой степени кристалличности материала. Отсутствие дополнительных пиков на дифрактограммах нанокристаллического апатита, как увлажнённого, так и высушенного (или лиофилизированного), интерпретируется как свидетельство отсутствия кристаллического дальнего порядка в его гидратированном слое.

Сопоставление Фурье ИК-спектров высушенного (в том числе лиофилизированного) и увлажнённого нанокристаллического апатита, Рис. 6-3, показало, что материал гидратированного слоя утрачивает свою характерную структуру при высушивании образцов, однако локальные окружения ионов по-прежнему отличаются от таковых в апатите, [286]. В то же время дифрактограмма при высушивании не изменяется, и из этого делается вывод об аморфности высушенного гидратированного слоя.

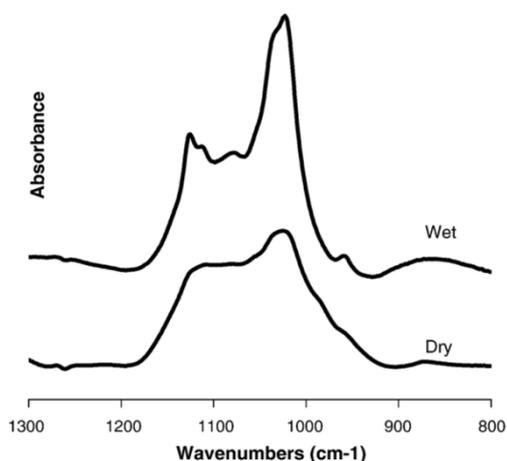


Рис 6-3. Влияние высушивания на Фурье ИК-спектры нанокристаллического гидроксилапатита в области $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$. Отчётливые узкие линии поглощения различимые в спектрах увлажнённых образцов (вверху) утрачиваются и(или) уширяются после высыхания (внизу). Из обзора [286].

Оценки состава. В нескольких исследованиях были предприняты попытки определения состава и структуры гидратированного слоя апатита сопоставлением его спектральных характеристик с аналогичными спектрами известных ортофосфатов кальция. Согласно авторам обзора [289], Фурье ИК-спектры гидратированного слоя апатита обнаруживают разительное сходство со спектрами октакальциевого фосфата (ОСР, см. Таблицу 6-1), но не тождественны им. В то же время, спектры ЯМР на ядрах ^{31}P гидратированного слоя имеют мало общего с таковыми для ОСР.

Значительных успехов в определении состава гидратированного слоя и прояснении его взаимоотношений с апатитом добились авторы [290], исследовавшие синтезированный ими нанокристаллический гидроксилапатит методами двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^{31}P , ^1H . Авторы продемонстрировали наличие структурной воды в гидратированном слое. Кроме того они показали, что примерно 50 % ядер ^{31}P исследованного ими образца входит в состав гидроксилапатита, и тем самым оставшаяся половина входит в состав гидратированного слоя. Им также удалось оценить отношение фосфата к гидрофосфату в этом слое. Согласно их оценке, $1/3$ общего количества фосфатов гидратированного слоя составляют ионы HPO_4^{2-} , а $2/3$ приходятся на PO_4^{3-} . Тем самым, отношение гидрофосфат/фосфат совпало с таковым для ОСР. Затем, комбинируя результаты расшифровки спектров с данными валового химического анализа, авторы оценили отношение Ca/P для гидратированного слоя, оказавшееся равным 1.52; это лишь немногим больше соответствующего значения для ОСР, составляющего 1.51. Далее, изучив обменные взаимодействия спинов ^1H , авторы показали, что апатитовая фаза и материал гидратированного слоя пространственно не разделены. Это согласуется с представлением о гидратированном слое как о тонком слое на поверхности кристаллов, не уединяющимся в отдельные стяжения. Наконец, замерив размеры нанокристаллов по изображениям в сканирующем электронном микроскопе, авторы смогли оценить и толщину гидратированного слоя, оказавшуюся равной 1 nm, Рис. 6-4.

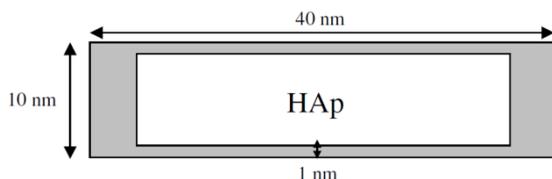
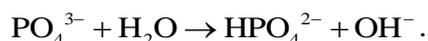


Рис 6-4. Схема строения апатитового нанокристалла согласно оценкам работы [290]. Затенённым показан гидратированный слой.

Необходимо отметить, что некоторые линии в ЯМР -спектре ^1H исследованного в [290] гидроксилапатита остались неотожествлёнными. Кроме того, свои оценки состава и толщины гидратированного слоя авторы вывели в предположении, что апатитовое ядро

каждого нанокристалла представляет собой стехиометрический гидроксилapatит, в котором фосфор присутствует только в виде анионов PO_4^{3-} , а протоны присутствуют только в составе гидроксила OH^- , в то время как в гидратированном слое протоны присутствуют в составе групп HPO_4^{2-} и молекул H_2O , а фосфор – в виде групп HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} . Наконец, в своих построениях авторы постулируют наличие идеального кристаллического порядка в апатитовом ядре и полное отсутствие такого порядка в гидратированном слое. Все эти предположения, конечно, являются грубым упрощением реальной ситуации. Молекулы воды могут присутствовать в интерстициях апатитовой решётки. Например, интерстициальная вода обнаружена в биоapatите кости методами спектроскопии ЯМР, [291]. Далее, согласно [286], эта вода может непосредственно в решётке осуществить гидролиз PO_4^{3-} с образованием HPO_4^{2-} и дополнительных OH^- :



Тем самым, гидроксил – это не единственный возможный источник протонов в апатите, а отношение $\text{PO}_4^{3-}/\text{OH}^-$ в гидроксилapatите не всегда является фиксированной константой. Кроме того, нанокристаллический гидроксилapatит характеризуется низкой степенью кристалличности, очевидной из уширения пиков на рентгеновских дифрактограммах и диффузного характера некоторых отражений. Поэтому постулируемое авторами наличие идеального дальнего порядка в апатитовых ядрах нанокристаллов вызывает большие сомнения, как впрочем и постулируемое ими отсутствие кристаллического дальнего порядка в гидратированном слое, маловероятного ввиду сходства последнего с ОСР. Тем не менее, оценка отношения $\text{Ca}/\text{P}=1.52$ для поверхностного слоя апатита, полученная в [290], в пределах точности совпадает с величиной $\text{Ca}/\text{P}=1.4-1.5$, полученной независимыми методами в [292] и [293] (см. ниже). Поэтому главный вывод авторов о близости состава гидратированного слоя к составу ОСР представляется вполне правдоподобным.

Упомянутое выше значение $\text{Ca}/\text{P}=1.4-1.5$ было получено в [292] рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией поверхности карбонатированного гидроксилapatита. Сходные цифры были получены (тем же методом) автором диссертации [245], исследовавшей порошки нанокристаллического гидроксилapatита и фторапатита. Для этих двух фаз величина Ca/P составила, соответственно, 1.4 и 1.5. (Для апатита, напомним, это отношение составляет 1.67). Резюмируя, едва ли есть основания сомневаться, что отношение Ca/P гидратированного слоя апатита близко к соответствующему значению для ОСР, но данные о степени протонирования анионов менее определённые. Наличие групп HPO_4^{2-} (как в ОСР) можно считать доказанным, но вероятно также присутствие PO_4^{3-} и, возможно, $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$.

Гидратированный слой, вероятно, близок к ОСР не только по составу, но и по структуре. Сходство их Фурье ИК-спектров говорит о сходном окружении фосфат-ионов. В свете этих данных, особое значение приобретает тесное структурное родство гидроксилapatита и ОСР.

Структурные взаимоотношения апатита и ОСР. Кристаллическая структура ОСР, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, была расшифрована в 1962 г. в работе [294] и позднее уточнена в [295]. Подробное её описание имеется в обзоре [296]. Кристаллы триклинные, пространственная группа $P\bar{1}$, с параметрами решётки $a = 19.692 \text{ \AA}$, $b = 9.523 \text{ \AA}$, $c = 6.835 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.15^\circ$, $\beta = 92.54^\circ$, $\gamma = 108.65^\circ$. Структура составлена из слоёв двух типов, называемых, соответственно, «apatитовый» и «гидратированный», чередующихся вдоль оси x (параллельно грани (100)), Рис. 6-5. Апатитовый слой ОСР состоит из ионами Ca^{2+} и

PO_4^{3-} , располагающимися в позициях близких к таковым в гидроксилapatите. В то же время, гидратированный слой, не обнаруживающий сходства с апатитом, слагается катионами Ca^{2+} и анионами HPO_4^{2-} . В этих же слоях содержатся вся входящая в состав кристалла вода.

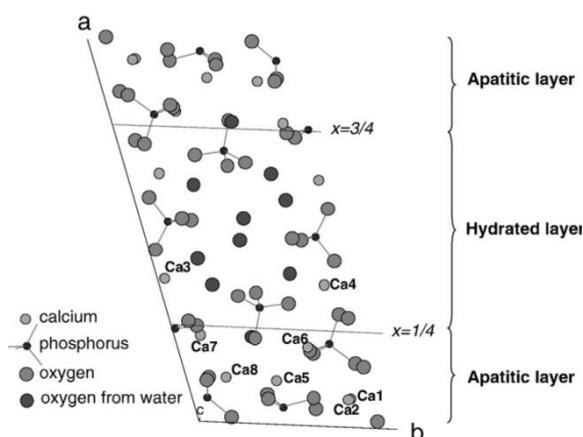
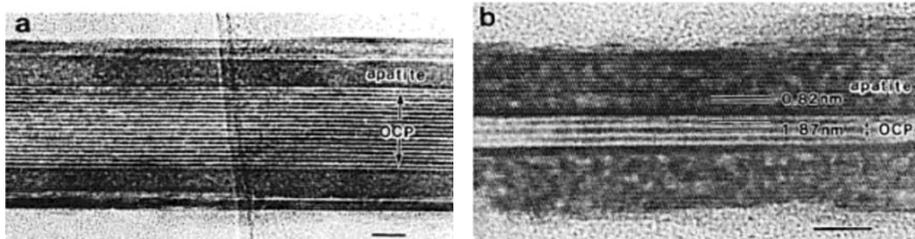


Рис 6-5. Кристаллическая структура октакальциевого фосфата (ОСР); проекция вдоль оси z . Атомы водорода не показаны в целях ясности. Из работы [297].

Интересную особенность структуры ОСР составляют молекулы воды и атомы кислорода на плоскостях $x = 1/4$ и $x = 3/4$, составляющих плоскости сопряжения апатитового и гидратированного слоёв. В гидроксилapatите на этой плоскости должны были бы находиться ионы OH^- , располагающиеся в углах его элементарной ячейки. В ОСР, в соответствующих позициях, попеременно, обнаруживаются молекула воды и кислород аниона HPO_4^{2-} . Данные соотношения указывают на возможность сопряжения структур гидроксилapatита и ОСР, при котором плоскость $(10\bar{1}0)$ апатита, с которой удалены ионы OH^- , совпадает с плоскостью (100) ОСР. Ось z апатита при этом оказывается параллельной или антипараллельной оси z ОСР.

Срастания апатита и ОСР действительно обнаруживаются в синтетических ортофосфатах кальция. Различными авторами описаны как эпитаксиальные нарастания апатита на ОСР, так и смешанные кристаллы, состоящие из чередующихся ламелей со структурой апатита и ОСР, [298-303]. Изображения таких ламелярных структур, полученные электронной микроскопией высокого разрешения, показаны на Рис. 6-6 вместе со схемой, поясняющей взаимную ориентацию ламмелей. Плоскость $(10\bar{1}0)$ апатитовых ламмелей действительно совпадает с (100) ОСР. Были синтезированы и смешанные кристаллы, в которых толщина ламмелей ОСР в направлении оси x составляет от одного до нескольких параметров a элементарной ячейки, [303].



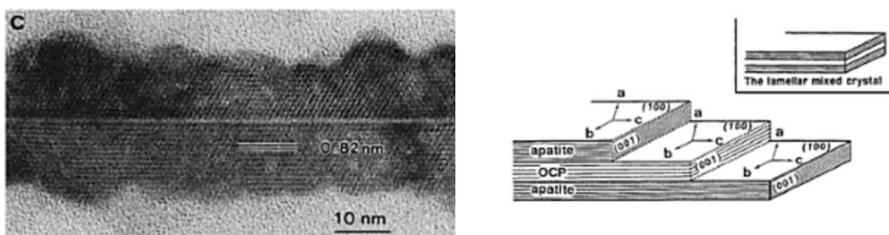


Рис 6-6. Изображения эпитаксиальных сростаний октакальциевого фосфата (ОСР) и фторированного гидроксилapatита (apatite) полученные просвечивающей электронной микроскопией. Схема справа внизу поясняет взаимное расположение кристаллитов. Апатит разрастается эпитаксиально по плоскости (100) ОСР. В результате lamель ОСР оказывается заключённой в кристалле апатита. Образцы получены выращиванием на ион-селективной мембране в присутствии 0.1 ppm F⁻ (a) и 1.0 ppm F⁻ (b,c). Длина масштабной линейки – 10 nm.

Из статьи [298].

Структурная аналогия гидратированных слоёв апатита и ОСР. Существование эпитаксиальных структур и смешанных кристаллов, в которых гидратированный слой ОСР сопрягается с гранью (10 $\bar{1}$ 0) апатита, наводят на мысль о возможной аналогии между гидратированным слоем ОСР и гидратированным слоем на поверхности апатитовых кристаллов. Оба слоя богаты двухзарядными ионами Ca²⁺ и HPO₄²⁻, оба содержат структурно-связанную воду. По всей видимости, впервые гипотеза о сходстве двух гидратированных слоёв была предложена из кристаллохимических соображений в работе [304], ещё в 1984 г. Появившиеся позднее данные о сходстве гидратированного слоя апатита с ОСР, выявленные методами Фурье ИК-спектроскопии и ЯМР, по существу, стали её подтверждением.

Интересно сопоставить оценку толщины гидратированного слоя апатита, полученную в [290] на основании данных спектроскопии ЯМР (см. Рис. 6-4) с толщиной одноимённого слоя в ОСР. Используя элементарные тригонометрические соотношения и параметры

решётки ОСР, толщина гидратированного слоя в нём составляет $\frac{1}{2}a \sin(\gamma) = 9.33 \text{ \AA}$. Это в

пределах 10% совпадает с оценкой 1 nm, полученной в [290]. Таким образом, оба гидратированных слоя близки не только по составу, но и по толщине. Кроме того, локальное окружение ионов в обоих слоях должно быть сходным ввиду сходства соответствующих Фурье ИК-спектров. Однако предположение о сходстве двух гидратированных слоёв не согласуется с выводом авторов [286,305] об отсутствии в гидратированном слое апатита кристаллического дальнего порядка. Наличие такого порядка в гидратированном слое ОСР показано рентгенографическими методами. Противоречие это – на самом деле кажущееся – разрешается обращением к первоисточнику.

Вывод авторов [286,305] об аморфности гидратированного слоя апатита был сделан на основании результатов порошковой рентгенографии. На дифрактограмме нанокристаллического апатита не обнаруживаются пиков каких-либо дополнительных фаз, помимо собственно апатитовых. Поскольку, согласно [290], гидратированный слой составляет примерно половину массы образца и при этом резко отличается от апатита по составу, вывод о его аморфности представляется вполне обоснованным. Но только на первый взгляд.

Предположим, что гидратированные слои апатита и ОСР тождественны и имеют аналогичное распределение электронной плотности. В таком случае рентгеновские отражения от гидратированного слоя апатита должны совпадать с какими-то отражениями ОСР. Вопрос о возможности обнаружении примеси фазы ОСР в апатите (и апатита в ОСР) из рентгенографических данных был досконально изучен авторами работы [299], выполненной в интересах космической медицины. (При длительном пребывании в условиях невесомости в теле космонавта образуются крупные кристаллы ОСР. Причины

этого явления остаются загадкой.) Согласно выводам авторов [299], определение примеси ОСР на порошковой рентгенограмме апатита составляет исключительно сложную задачу, невыполнимую, если исследуемые кристаллы имеют малые размеры.

Трудности рентгенографического определения примеси ОСР в апатите проистекают из близости обеих структур. Согласно [299], все межплоскостные расстояния триклинного ОСР меньшие 0.9 nm перекрываются близкими по величине межплоскостными расстояниями апатита. Отражения $1\bar{1}0$ и 010 ОСР ($d_{1\bar{1}0} = 0.949$ nm, $d_{010} = 0.911$ nm) присутствуют на рассчитанной дифрактограмме и не перекрываются пиками апатита, но на практике оказываются неразличимыми на уровне фона. Имеется только одна линия 1.878 nm (100) ОСР, присутствие которой на дифрактограмме достоверно показывает наличие ОСР в образце. Оставляя в стороне технический вопрос о наличии в распоряжении авторов [286,230], сделавших вывод об отсутствии дальнего порядка в гидратированном слое апатита, специальной камеры для съёмки в области столь малых углов ($2\theta \approx 4^\circ$), это отражение *в принципе* не могло появиться на дифрактограмме апатита с гидратированным слоем. Как видно на Рис. 6-5, межплоскостное расстояние d_{100} ОСР складывается из толщины апатитового слоя, толщины гидратированного слоя и толщины ещё одного апатитового слоя. Поскольку в интересующем нас случае апатита с гидратированным слоем второй апатитовый слой отсутствует, то и отражение, соответствующее $d_{100} = 1.878$ nm на дифрактограмме, возникать не должно. Тем самым, бытующее мнение об отсутствии в гидратированном слое апатита кристаллического дальнего порядка основано на ложных посылах и, скорее всего, является ошибкой. Предположение о сходстве гидратированного слоя апатита с одноименным слоем ОСР согласуется как с данными спектроскопии, так и рентгенографическими замерами.

Важно оговориться, что аналогия между двумя обсуждаемыми гидратированными слоями не может быть полной. Во-первых, как уже было сказано, в ОСР гидратированный слой «зажат» с обеих сторон двумя апатитовыми слоями, в то время как поверхностный гидратированный слой апатита «приставлен» к грани $(10\bar{1}0)$ кристалла лишь с одной стороны. Во-вторых, простая форма $(10\bar{1}0)$ апатита, представляющая собой гексагональную призму, не образует ограниченного многогранника. Тем самым, любой кристалл конечных размеров должен иметь какие-то другие грани в дополнение к $(10\bar{1}0)$ (и это отчётливо видно на изображениях нанокристаллов апатита в сканирующем электронном микроскопе). Однако эти, дополнительные, грани с гидратированным слоем ОСР сопряжены быть не могут. Следовательно, грани отличные от призмы $(10\bar{1}0)$ могут иметь гидратированный слой какой-то иной структуры, или даже не иметь его вовсе. Указанными двумя обстоятельствами, возможно, и объясняется упоминавшееся выше наличие неотожествлённых линий в спектрах ЯМР нанокристаллического апатита.

В то же время вывод об отсутствии дальнего порядка в поверхностном слое высушенных апатитовых кристаллов, гидратированный слой которых разрушен, скорее всего, соответствует действительности. Такой слой виден на изображениях нанокристаллов апатита, полученных в работе [305] при помощи электронной микроскопии высокого разрешения, Рис. 6-7. Авторы отмечают разупорядочение поверхности (*periphery surface disorder*), отчётливо различимое при более сильном увеличении, Рис 6-7, D. (Из текста статьи следует, что данному коллективу исследователей не было известно о феномене гидратированного слоя.)

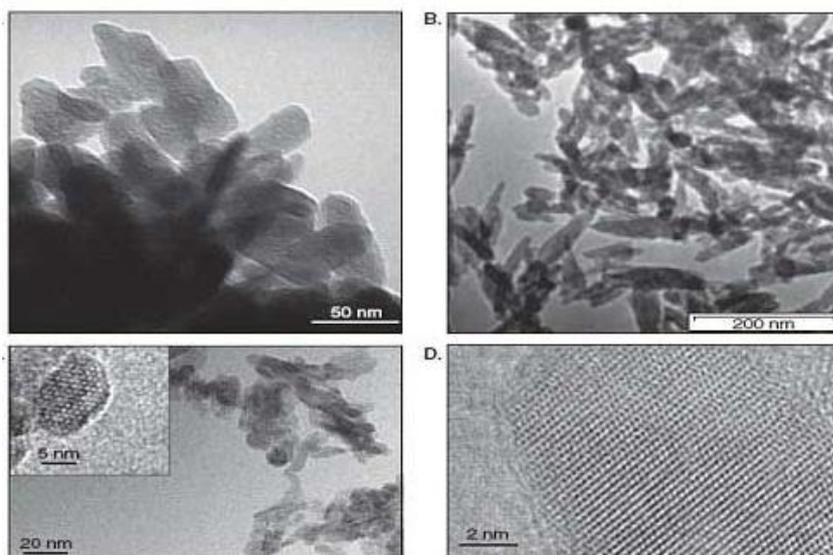


Рис 6-7. Нанокристаллы карбонированного гидроксилapatита под электронным микроскопом высокого разрешения. Изображения в проходящих электронах. *Из работы [305].*

Ионообмен и структурные перестройки в гидратированном слое. Изложенные выше оценки состава и структуры гидратированного слоя апатита, свидетельствующие о сходстве его с одноимённым слоем в ОСР, базируются всецело на данных спектроскопии. В то же время представления 1950-х гг. об этом слое основывались, главным образом, на анализе данных по кинетике межфазового обмена, с привлечением постулированных модельных схем обмена. Возникает вопрос о правомочности отождествления этих двух явлений. Впрочем, утвердительный ответ на этот вопрос не вызывает сомнений. Способность гидратированного слоя быстро обмениваться ионами с раствором, привлёкшая внимание исследователей в 1950-х гг, была подтверждена современными исследованиями. При этом использование методов спектроскопии позволило обнаружить и сопутствующие ионообмену структурные превращения в слое.

Наиболее детально ионообмен изучен для замещений $Mg^{2+} \rightarrow Ca^{2+}$, $Sr^{2+} \rightarrow Ca^{2+}$ и $CO_3^{2-} \rightarrow HPO_4^{2-}$ в гидратированном слое гидроксилapatита и карбонированного гидроксилapatита, [297, 306]. Если растворы солей указанных ионов (таких как одномолярные бикарбонат аммония, нитрат магния) привести в контакт с взвесью нанокристаллического апатита, то очень быстро (в течение нескольких минут при комнатной температуре) концентрация соответствующего иона уменьшится до некоторой фиксированной величины. Сравнение анализов раствора и кристаллов до и после реакции показывает, что имеет место вытеснение иона осадка ионом раствора в пропорции 1:1. Стехиометрия апатита при этом не меняется (в случае одновременного замещения $Mg^{2+} \rightarrow Ca^{2+}$ и $CO_3^{2-} \rightarrow HPO_4^{2-}$ отношение $Ca+Mg/P+C$ осадка остаётся постоянным). Если затем осадок адсорбировавший Mg^{2+} или Sr^{2+} поместить в раствор соли кальция, например $CaNO_3$, то вытеснение столь же быстро протекает в противоположном направлении, но не полностью. Примерно 85% Mg и 75-80% Sr может быть возвращено в раствор, а остальное становится частью апатитового ядра нанокристалла, вероятно вследствие перекристаллизации в процессе укрупнения кристаллов. Сходным образом, адсорбированный апатитом карбонат обменивается на гидрофосфат, если, например, осадок, предварительно обработанный одномолярным раствором $(NH_4)_2CO_3$, поместить в одномолярный раствор $(NH_4)_2HPO_4$.

Быстрота процесса ионного обмена и его обратимый характер, согласно [297,306], составляют характерную черту гидратированного слоя. Процесс, очевидно, не затрагивает апатитового ядра нанокристаллов, поскольку их рентгеновские дифрактограммы до и после обмена оказываются идентичными. В то же время вариации состава гидратированного слоя сопровождаются обратимыми изменениями ИК-спектров, свидетельствующими о перестройках его структуры.

На Рис. 6-8 показаны Фурье ИК-спектры нанокристаллического апатита в области ν_4 PO_4 до и после обработки его раствором соли магния; для сравнения там же приведён спектр ОСР. Как можно видеть, до обработки спектр нанокристаллического апатита обнаруживает отчётливое сходство с таковым ОСР. После обработки детали спектра сглаживаются, свидетельствуя об изменении локального окружения фосфатов в гидратированном слое.

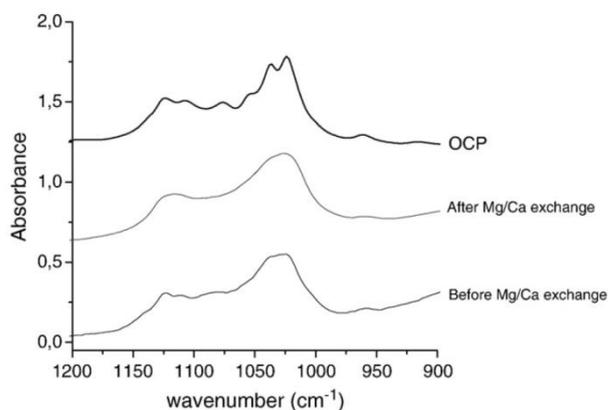


Рис 6-8. Влияние замещения $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ в гидратированном слое нанокристаллического апатита на его Фурье ИК-спектр в области $\nu_3\text{PO}_4$, в сравнении с спектром ОСР.

Указанные изменения ИК-спектров носят обратимый характер. На Рис. 6-9 показаны Фурье ИК-спектры той же области, что и на Рис 6-8. Три кривые слева соответствуют замещению $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{HPO}_4^{2-}$, кривые справа – замещению $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$. Нижние кривые справа и слева представляют исходный образец, средние кривые соответствуют замещённым образцам, а верхние – результатам обратного замещения. Как можно видеть, верхние и нижние кривые весьма сходны для обоих типов замещений в образцах, что говорит о восстановлении их первоначальной структуры. Как справедливо отмечают авторы [297], указанные изменения ИК-спектров, вероятно, служат внешним проявлением некоего фазового перехода в гидратированном слое.

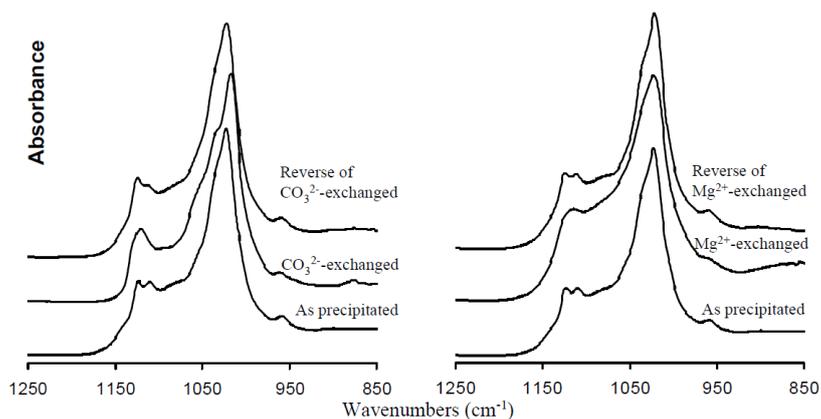


Рис 6-9. Обратимые изменения в Фурье ИК-спектрах увлажнённого нанокристаллического гидроксилapatита в результате обмена ионов в гидратированном слое: слева, замещение $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{HPO}_4^{2-}$; справа, замещение $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$.

Интересную, пока малоизученную особенность ионных замещений в гидратированном слое апатита составляет их избирательность. Общее количество кальция, которое может быть замещено на примесный катион, оказывается различным для разных катионов. Например, согласно некоторым указаниям, одновалентные ионы Na^+ и K^+ не замещают катионов в гидратированном слое (хотя оба, при определённых условиях, могут замещать Ca^{2+} в решётке апатита). Этим Na^+ и K^+ разительно отличаются от Mg^{2+} и Sr^{2+} . Причины этих различий пока не выявлены. Валентность катиона не может быть решающим фактором. Например, значительное количество Ca^{2+} в гидратированном слое может быть обратимо обменено на одновалентный ион Ag^+ , [307]. Сходные различия, видимо, имеют место и для анионов. Например, известно, что, в отличие от CO_3^{2-} , присутствие иона SO_4^{2-} в растворе на состав гидратированного слоя не оказывает влияния, [308].

Вопрос о стабильности слоя. Наличие гидратированного слоя необходимо учитывать при исследовании адсорбции органических молекул апатитом. Например, согласно [309], аденозинмонофосфат проявляет тенденцию накапливаться в гидратированном слое апатита, но при этом, в области малых концентраций, адсорбции его поверхностью не происходит.

В этой связи для нас важно понять, является ли гидратированный слой стабильным образованием, присущим интерфейсу апатит/раствор, или же этой слой возникает на некоей промежуточной стадии кристаллизации минерала, характерен только для нанокристаллов и исчезает по мере их укрупнения. Данные об адсорбции различных молекул апатитом, все без исключения, получены с использованием суспензий нанокристаллов. Если гидратированный слой присущ лишь нанокристаллам и отсутствует у более стабильных макроскопических кристаллов апатита, экспериментальные данные о сорбции могут оказаться непригодными для планирования работ по абиогенной полимеризации нуклеотидов, требующих макроскопических кристаллов, по длине соизмеримых с природной ДНК.

Согласно [310], при выдержке суспензии свежесозданного нанокристаллического апатита в течение нескольких недель происходит постепенное укрупнение кристаллов. Одновременно в ИК-спектрах уменьшается интенсивность полос поглощения 617 и 534 cm^{-1} , соотнесенных с гидратированным слоем. Эти данные допускают двойное толкование: с одной стороны, исчезновение характерных линий в ИК-спектрах может быть следствием постепенного преобразования гидратированного слоя в апатит. С другой, изменения ИК-спектров могут быть следствием уменьшения отношения поверхности кристаллов к их

массе в процессе укрупнения, без каких-либо изменений структуры и состава гидратированного слоя.

В пользу второй точки зрения свидетельствуют данные [292]. Авторы статьи синтезировали нанокристаллический гидроксилapatит двух морфологических типов. В обоих случаях кристаллы имели пластинчатую форму, но в первом длина пластин была порядка 20 nm, а во втором – 100 nm. Анализ поверхности кристаллов с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показал, что в обоих случаях отношение $Ca/P = 1.4-1.5$ близко к таковому в ОСР (1.51); сравнительное исследование не выявило никаких отличий в составе поверхности образцов, существенно отличающихся размерами. Таким образом, укрупнение кристаллов не привело к изменению гидратированного слоя.

Ещё одну возможность для прояснения природы гидратированного слоя дают оценки заряда поверхности кристаллов апатита погруженных в электролит. Допустим, что гидратированный слой является лишь промежуточной стадией в процессе кристаллизации апатита. Тогда подобный слой не должен образовываться при погружении в воду кристаллов апатита, полученных при высокой температуре (скажем, при 800-1000° С). Тем самым, интерфейс кристалл/раствор для высокотемпературных кристаллов будет иметь структуру отличную от наблюдаемой для нанокристаллического апатита, и усреднённый заряд интерфейса, вероятно, будет другим.

В качестве характеристики усреднённого заряда поверхности кристалла погружённого в электролит обычно используют т.н. ζ -потенциал. Величина ζ -потенциала апатита непосредственно сказывается на реологических свойствах различных паст, цемента, стоматологических препаратов, изготавливаемых с применением апатита. Имеется обширная литература, посвященная её определению, в основном из замеров электрофоретической подвижности частиц в суспензиях. Величина ζ -потенциала апатита, впрочем, достаточно сложным образом зависит от состава электролита [312], поэтому сравнивать свойства поверхности имеет смысл лишь для кристаллов полученных различными способами, но исследованных в идентичных условиях. Такие замеры обнаруживаются в работе [313].

Авторы [313] сравнили значения ζ -потенциала для суспензий нанокристаллического апатита приготовленного при 60° С, 80° С, и для полнокристаллического апатита приготовленного при высокой температуре. Поверхность кристаллов во всех случаях заряжена отрицательно, и величина ζ -потенциала для полнокристаллического образца близка к таковому для нанокристаллического гидроксилapatита синтезированного при 60°. Тем самым, замеры ζ -потенциала тоже свидетельствуют в пользу сходного строения интерфейса кристалл/электролит для макро- и нанокристаллов, вне зависимости от температуры их приготовления.

Ещё один аргумент в пользу стабильности гидратированного слоя вытекает из сходства его с гидратированным слоем ОСР. Судя по данным о растворимости, ОСР является термодинамически метастабильной фазой (менее устойчивой, чем гидроксилapatит). Тем не менее, кристаллы этого ортофосфата могут храниться неограниченно долго.

Очевидно, приведённые данные легче объяснить исходя из предположения о гидратированном слое как о стабильном образовании, присутствующем в условиях термодинамического равновесия на поверхности, по крайней мере, некоторых граней (прежде всего – гексагональной призмы $(10\bar{1}0)$). Более того, имеются указания на *возникновение* гидратированного слоя в результате химического взаимодействия воды с поверхностью керамического апатита.

В работе [315] поверхность керамического апатита, стехиометрического, полученного при высокой температуре, увлажняли водными растворами различного состава (дистиллированная вода, раствор NaCl, межклеточная жидкость, раствор, насыщенный гидроксилapatитом). Во всех случаях анализ поверхности методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показал уменьшение отношения Ca/P в

приповерхностном слое, вплоть до значения $Ca/P = 1$, как в DCPD (см. Таблицу 6-1; по составу гидратированный слой ОСП отличается от DCPD только бóльшим количеством молекул воды). Далее, тем же методом, а также с помощью Фурье ИК-спектроскопии было показано присутствие ионов HPO_4^{2-} , (при этом, как отмечают авторы, ИК-спектры поверхности не похожи на спектры DCPD). Кроме того авторы обнаружили, что в присутствии карбонат-ионов, ИК-спектры поверхности претерпевают изменения аналогичные обсуждавшимся выше изменениям ИК-спектрах нанокристаллического апатита при замещении $CO_3^{2-} \rightarrow HPO_4^{2-}$, показанных на Рис. 6-8.

В силу вышеизложенного у нас нет оснований сомневаться в том, что гидратированный слой апатита является термодинамически стабильным образованием. В силу этого, данные об адсорбции молекул с кислотными группами, обсуждаемые в следующем разделе, полученные, как было сказано выше, в экспериментах с нанокристаллическими суспензиями, могут быть перенесены на соответствующие грани макроскопических кристаллов.

Ещё один вопрос, важный для приложений, касается влияния вариаций состава на стабильность гидратированного слоя. Имеющиеся сведения о гидратированном слое апатита, полученные с целью дальнейшего применения в фармакологии, медицине, стоматологии и т.д., в силу специфики, не выходят за рамки типичных компонентов биоапатита: гидроксилapatита, карбонатированного гидроксилapatита и фторированного гидроксилapatита. Имеются также данные для карбонатированного фторapatита и тройных смесей. Во всех исследованных разностях характеристики гидратированного слоя оказываются сходными, свидетельствуя о сходстве состава и структуры этого слоя. Поэтому можно предположить, что гидратированный слой составляет особенность интерфейса кристалл/вода и других разновидностей апатита, не исследовавшихся экспериментально, например представляющих особый интерес хлорapatита и бромapatита.

Возможные причины возникновения слоя. Значение гидратированного слоя апатита для естественного трудно переоценить. Как будет показано в следующем разделе, способность именно этого слоя к избирательной адсорбции нуклеиновых кислот и аминокислот создала посылки для запуска процессов молекулярной эволюции. В этой связи возникает вопрос: является ли гидратированный слой уникальным явлением, присущим только апатиту и возможно ещё нескольким ортофосфатам щелочноземельных металлов, или же гидратированный слой образуется и на других кристаллах при погружении их в воду, но нам об этом неизвестно в силу недостаточной их изученности. Иначе говоря, является ли гидратированный слой проявлением каких-то уникальных взаимодействий, или же это следствие феноменальной изученности минерала? Обсуждавшаяся выше аналогия между гидратированным слоем на поверхности апатита и одноимённым слоем в структуре ОСП свидетельствует в пользу первой точки зрения. Насколько я могу судить, чередование гидратированного и апатитовых слоёв в кристаллической структуре ОСП, когда один слой содержит протонированные анионы и молекулы воды, а в другом те же анионы протонированными не являются, и вода отсутствует, составляет явление уникальное.

Мне не удалось найти теоретических исследований возможных причин сосуществования двух контрастных слоёв – гидратированного и апатитового – в ОСП и на некоторых гранях кристаллов апатита. Однако имеется публикация, посвящённая теоретическому моделированию взаимодействия гидроксилapatита с водой, выполненная вне связи с проблемой гидратированного слоя, в какой-то мере проясняющая вопрос.

В работе [314], с использованием пакета программ CRYSTAL06, моделировалось взаимодействие двух граней гидроксилapatита с водой. Напомним, гидратированный слой в структуре ОСП сопрягается с апатитовым слоем по плоскости аналогичной грани

(10 $\bar{1}0$) гидроксилapatита. Авторы моделировали взаимодействие молекул воды с гранями (0001) и (10 $\bar{1}0$) стехиометрического гидроксилapatита. Согласно их расчётам, молекулы H₂O обнаруживают высокое сродство к граням обоих типов; однако в первом случае вода адсорбируется в молекулярной форме, а во втором имеет место её диссоциация с образованием гидрофосфат-ионов, а также комплексов CaOH⁺. Высокое значение полученной авторами энергии диссоциации воды (от -250 до -320 kJ/mol, в пересчёте на 1 моль молекул воды), как они считают, доказывает невозможность сосуществования неизменённой грани (10 $\bar{1}0$) стехиометрического гидроксилapatита с водой.

К сожалению у нас нет возможности сравнить полученные в [314] оценки энтальпии взаимодействия граней апатит а с водой с экспериментальными замерами. В литературе имеются данные по энтальпии адсорбции и энтальпии погружения апатита (в воду), но все они, увы, выполнены на образцах полученных высушиванием или прокаливанием нанокристаллического апатита. Такие кристаллы сверху покрыты продуктами дегидратации гидратированного слоя, аморфным веществом неясной природы, спектроскопические характеристики которого, как было указано выше, отличаются от таковых стехиометрического гидроксилapatита.

Согласно данным детального исследования влияния термообработки на свойства поверхности нанокристаллического гидроксилapatита [244], линии протонированных форм фосфата (отсутствующих в апатите) различимы в ИК-спектрах при всех температурах ниже 400° С, а при более высокой температуре в остатке гидратированного слоя на поверхности кристаллов имеет место конденсация фосфатных групп с образованием пирофосфата кальция. Поэтому калориметрические данные о взаимодействии жидкой или парообразной воды с термообработанными порошками нанокристаллического апатита, очевидно, не дают информации о взаимодействии H₂O со стехиометрическим Ca₅(PO₄)₆OH.

Вне зависимости от того, являются ли полученные в [314] оценки энтальпии взаимодействия грани (10 $\bar{1}0$) гидроксилapatита с водой завышенными или нет, расчёты этих авторов не объясняют, почему химическая реакция затрагивает лишь верхний нанометр толщины кристалла. Руководствуясь оценками авторов, мы должны были бы сделать вывод, что, ввиду высокой проницаемости гидратированного слоя, вода должна разложить кристалл целиком, переведя весь фосфат в гидрофосфат. По всей видимости, природа гидратированного слоя апатита (равно как и природа одноимённого слоя в ОСР) не может быть понята без учёта поверхностной энергии, вносящей значительный вклад в величину его свободной энергии. Ни теоретических, ни экспериментальных оценок поверхностной энергии гидратированного слоя апатита пока сделано не было.

Значительный интерес представляет вывод авторов [314] об ориентационной контрастности химизма граней апатита. Различные молекулы с кислотными группами, адсорбция которых апатитом обсуждается в следующем разделе, проявляют повышенное сродство к граням гексагональных призм апатита, т.е. граням, подобно (10 $\bar{1}0$), ориентированным параллельно оси z кристалла. Необычный характер взаимодействия таких граней с молекулами воды, вероятно, и стал причиной появления на них гидратированного слоя, толщиной в нанометр, ставшего причиной необычного механизма адсорбции, сделавшего возможным спонтанное протекание процессов стемпинга, коим все мы в конечном итоге обязаны своим существованием.

Связь гидратированного слоя с нестехиометрией апатита. Наличием гидратированного слоя, отличающимся по составу от кристаллического ядра, вероятно, объясняется нестехиометрия нанокристаллического апатита, в особенности гидроксилapatита, типичная для нанокристаллов осаждаемых из растворов, [317,318], но

отсутствующая в более крупных кристаллах, полученных гидротермально, керамическими методами или во флюсах. Имеется большое количество экспериментальных данных о связи нестехиометрии апатита с условиями синтеза, однако обсуждать их здесь было бы нецелесообразно.

Гидратированный слой как причина стабилизации апатитовых нанокристаллов.

Число статей, а также различных патентов, посвященных получению и исследованию апатитовых нанокристаллов, столь велико, что никто, наверное, не был в состоянии прочесть их все. Их больше тысячи. Среди немногих, прочитанных мной, нигде не задан вопрос о причинах, обуславливающих лёгкость получения апатитовых нанокристаллов в лаборатории. Смешивание водных растворов солей кальция с водными же растворами фосфатов, при не слишком низких значениях pH, почти всегда сопровождается образованием кристаллических чешуек апатита, толщиной в несколько нанометров. Ограничивающие поверхности чешуек – это всегда грани гексагональной призмы. При осаждении других малорастворимых солей кальция – сульфатов, карбонатов, силикатов – получаются либо полнокристаллические осадки, либо гели.

Помимо лёгкости получения, показательна также способность апатитовых нанокристаллов сохранять форму в течение длительного времени. Постепенно укрупняясь, нанокристаллы сохраняют уплощённую форму, по крайней мере, на протяжении нескольких месяцев. Представляется разумным предположить, что именно гидратированный слой на поверхности граней призмы, в силу своей аномальной стабильности, способствует разрастанию нанокристаллов «вширь», увеличивая площадь граней призмы и препятствуя образованию других граней. Этот же слой, стабилизируя нанокристаллы, позволяет им существовать столь длительное время в виде водной суспензии. Сказанное лишний раз подтверждает высказанный ранее тезис, что гидратированный слой апатита представляет собой термодинамически стабильную субстанцию.

Вывод о формообразующей роли гидратированного слоя нанокристаллов апатита имеет принципиальное значение для интерпретации данных об адсорбции нуклеотидов и других молекул этим минералом. Почти все исследования адсорбции различных соединений апатитом, обсуждаемые ниже в этой главе, выполнены на суспензиях нанокристаллического апатита, либо на препаратах биоапатита, имеющего сходное строение. (Подчеркивая разительное сходство между нанокристаллическим апатитом и кристаллами апатита кости, дентина, а также биоапатита из очагов патологического кальцинирования мягких тканей, многие современные авторы вместо *nanocrystalline apatite* пишут *biomimetic apatite*.) Тем самым, данные о сорбции различных молекул апатитом, обсуждаемые далее, характеризуют сорбционную активность граней апатита, покрытых гидратированным слоем.

6.3. Адсорбция апатитом соединений с кислотными группами.

Как было указано во вводной части главы, в настоящем разделе сделана попытка выяснить механизм адсорбции нуклеотидов апатитом в условиях недостатка данных. Сведения о взаимодействии нуклеотидов с поверхностью апатита исчерпываются закономерностями, выявленными в практике апатитовой хроматографии, и несколькими изотермами адсорбции, полученных в исследованиях, выполненных в связи с проблемой происхождения жизни. Взаимодействия эти не привлекли внимания биохимиков или фармакологов, вероятно, потому, что в живой клетке полинуклеотиды и апатит практически никогда не приходят в соприкосновение. К счастью, в литературе имеются данные о взаимодействии других молекул с кислотными группами (фосфатными, фосфонатными и карбоксильными) с апатитом. Совместное рассмотрение таких данных

для кислотных белков и аминокислот, органических и неорганических полифосфатов, цитрата, фосфоцитрата, бисфосфонатов, полиалкеновых кислот убеждает в единстве механизме их хемосорбции апатитом. Ни для одного из перечисленных классов соединений взаимодействие с апатитом не было исследовано со степенью детальности, позволяющей идентификацию механизма хемосорбции. Однако, взятые вместе, экспериментальные данные допускают лишь единственное толкование. При сопоставлении сведений, полученных при изучении взаимодействия соединений различного химизма с апатитом, обнаруживаются разительные черты сходства, выявляющие единый механизм хемосорбции, позволяющие сформулировать условия, в которых интересующий нас процесс встраивания фосфатных групп нуклеотидов в структуру минерала должен протекать спонтанно.

Помимо разнообразия сорбируемых соединений, исследования в данной области отличаются также и разнообразием использованных методов. В дополнение к более или менее традиционным физико-химическим методам (распределение исследуемых соединений между поверхностью кристаллов и раствором, спектроскопия ЯМР высокого разрешения, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, калориметрическое титрование, рентгеноструктурные данные, атомно-силовая микроскопия), большое значение при изучении поверхностных свойств апатита придаётся методу, основанному на способности сорбируемых соединений замедлить нуклеацию, рост или растворение кристаллического апатита.

Способность веществ, сорбируемых поверхностью кристаллов, ингибировать их кристаллизацию и растворение – хорошо известное явление. Степень замедления процесса кристаллизации или растворения кристаллов апатита тем или иным соединением часто используют в качестве параметра, характеризующего его способность к адсорбции. Скорость (валовая) процесса кристаллизации апатита может быть измерена т.н. методом постоянства состава (*the constant composition kinetics*, см. Ch.3 обзора [319], наибольшее распространение получила его разновидность, т.н. *constant composition potentiostatic method*, [320, 321]). Для многих десятков соединений, главным образом органических и неорганических полифосфатов и бисфосфонатов, была измерена степень замедления ими процесса нуклеации кристаллов гидроксилапатита, [320,322,323,321]. Для многих соединений была также измерена их способность замедлять растворение гидроксилапатита, [324], и карбонатапатита, [325] (т.н. *constant composition dissolution experiments*). Ещё один метод количественной характеристики степени сродства молекул к поверхности гидроксилапатита, основанный на жидкостной апатитовой хроматографии, был разработан авторами [326].

Степени сродства молекул к поверхности апатита, измеренные подобными методами, представляют собой усреднённые характеристики. Они сыграли большую роль в разработке фармакологических препаратов, используемых в химиотерапии, профилактике остеохондроза и т.д. Литература, посвящённая определению таких характеристик весьма обширна. Однако в настоящем обзоре эти сведения упоминаются лишь эпизодически, поскольку они не характеризуют механизм сорбции как таковой. Кроме того, интерпретация данных затруднительна, потому что многие соединения демонстрируют более сложное поведение: на ранней стадии они ускоряют кристаллизацию апатита, способствуя ускоренной нуклеации кристаллов, но на более поздней стадии они же адсорбируются поверхностью растущих кристаллов, и кристаллизация замедляется.

В обзор включены все экспериментальные данные, имеющие отношение к интересующей нас проблеме, накопленные за последние 60 лет, доступные через интернет. Однако, ввиду недостаточной изученности, в обзор не были включены гликозаминогликаны. Кроме того, представляющие определённый интерес исследования органических полимеров с фосфатными группами, используемых при изготовлении некоторых стоматологических цементов, не могли быть рассмотрены в силу недоступности соответствующих публикаций через интернет. При всех выпадениях,

предлагаемый обзор избыточен. В конце его сформулированы эмпирические закономерности адсорбции, общие для всего класса соединений с кислотными группами, при этом каждая из выявленных закономерностей подтверждена как минимум двумя-тремя примерами соединений из разных классов. Теоретические исследования упоминаются лишь изредка, когда для этого есть специальные причины.

Необходимо оговориться, что предлагаемый обзор не претендует на изложение всех особенностей химизма поверхности апатитовых кристаллов. Кальциевые разновидности апатита, в первую очередь гидроксилapatит, уверенно можно отнести к числу *феноменально* изученных материалов. Из великого множества данных в обзор включены лишь сведения прямо или косвенно относящиеся к адсорбции интересующего нас класса молекул с кислотными группами. Адсорбция апатитом молекул других классов не рассматривается. За рамки настоящего обзора выведены также известные методы прививки (*grafting*) поверхности апатита молекулами полифосфатов, силанов и даже цирконила с образованием связей, соответственно, P–O–P, P–O–Si и P–O–Zr.

За изложением экспериментальных данных и обсуждением общих закономерностей в конце раздела обсуждается вероятный механизм адсорбции, движущие силы и способы регулирования этого процесса.

6.3.1 Адсорбция пирофосфата апатитом.

Взаимодействие неорганического пирофосфата (PPi на Рис. 6-10) с гидроксилapatитом изучалась многими авторами в 1960-1980 гг. в связи с его ярко выраженной способностью ингибировать нуклеацию кристаллов апатита, их рост и растворение. PPi считается одним из факторов, препятствующих патогенному кальцинированию тканей, см. например [327]. Было выполнено большое число исследований, таких как [322-324], посвященных влиянию PPi (наряду с другими полифосфатами, а также фосфонатами) на кинетику кристаллизации и (или) растворения гидроксилapatита и карбонатапатита. Мы не станем обсуждать результаты этих замеров, так как, при всей тщательности их выполнения, они практически ничего не дают для понимания механизма взаимодействия PPi с апатитом. Значительно больший интерес представляют изотермы адсорбции PPi апатитом, построенные в [328], а также данные об обмене ионами между раствором и кристаллами гидроксилapatита в процессе адсорбции ими PPi, полученные в [329,330,331]. Последние три работы особенно ценны тем, что их авторы ставили своей целью выяснить роль гидратированного слоя в адсорбции.

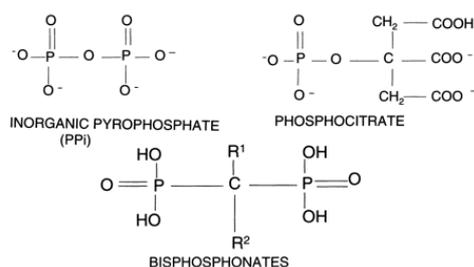


Рис 6-10. Неорганический пирофосфат, фосфоцитрат и бисфосфонаты. Молекулы показаны в степени ионизации характерной для нейтральных значений pH.

К сожалению, в биологических жидкостях PPi испытывает гидролиз, катализируемый некоторыми фосфатазами (в первую очередь щелочной фосфатазой) и различными пирофосфатазами. По этой причине он оказался бесперспективным с точки зрения фармакологических применений. После обнаружения бисфосфонатов, проявляющих способность ингибировать рост и растворение кристаллов апатита подобно PPi, но устойчивых к действию фосфатаз, интерес к PPi угас. В результате адсорбция PPi апатитом не была исследована современными спектроскопическими методами.

Кинетика и изотермы адсорбции. В работе [328] выполнено сравнительное исследование адсорбции PPi и двух бисфосфонатов гидроксилапатитом (данные для бисфосфонатов – хлодроната и этидроната обсуждаются ниже, в разделе 6.3.3). Авторы добавляли раствор PPi к суспензии кристаллов гидроксилапатита и методом радиоактивных меток исследовали процесс связывания PPi с поверхностью кристаллов и сопутствующего ему перераспределения кальция и ортофосфата между раствором и кристаллами. Особое внимание было уделено степени достижения термодинамического равновесия в опытах.

На Рис. 6-11 показаны кинетические кривые адсорбции PPi суспензией гидроксилапатита, построенные в [328]. После добавления PPi к суспензии, концентрация PPi в растворе быстро падает в течение первого дня, затем адсорбция резко замедляется, и количество PPi в растворе уменьшается лишь на несколько процентов в день. Основную часть замеров авторы выполняли через 43 часа после добавления PPi , так как при больших выдержках существенной становилась степень гидролиза PPi , катализируемого апатитом.

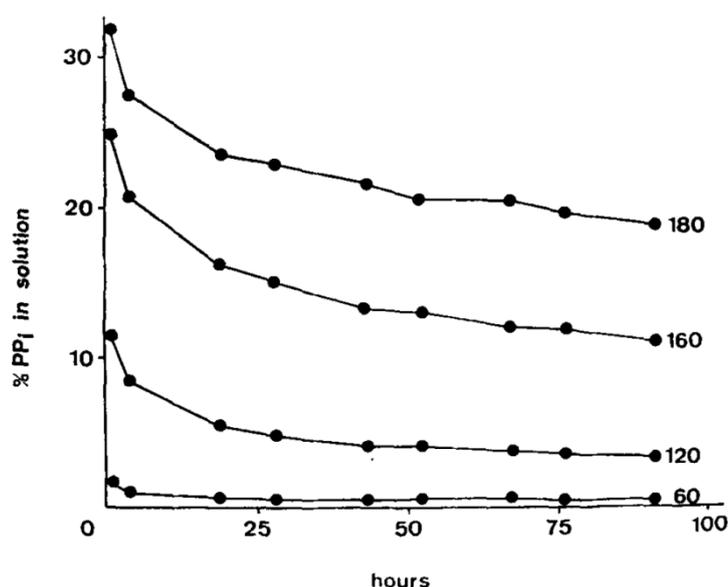


Рис 6-11. Удаление пиродифосфата (PPi) из раствора, по мере адсорбции его апатитом, при 4°C и $\text{pH } 7.4$ после добавления различных количеств PPi к взвеси 150mg апатита в 100ml водного раствора, предварительно приведённого в равновесие с гидроксилапатитом. Четыре кривые на графике соответствуют, как указано, добавлению 60 , 120 , 160 и $180 \mu\text{moles PPi}$ на каждый g апатита.

Из работы [328].

Построенные авторами [328] изотермы адсорбции PPi гидроксилапатитом при 4 , 20 и 37°C представлены на Рис 6-12. Сплошными линиями показаны кривые, полученные сразу после добавления PPi в раствор; штриховые линии представляют изотермы адсорбции, полученные после уравнивания системы в течение 43 часов. Авторы отмечают, что построение изотерм сорбции без достаточной выдержки создаёт иллюзию возрастания количества адсорбированного PPi с увеличением температуры. Однако, по достижении равновесия, температурная зависимость исчезает, во всяком случае, в диапазоне $4\text{--}20^\circ\text{C}$ (для 37°C изотерма адсорбции построена быть не может ввиду гидролиза значительных количеств PPi за время необходимое для достижения равновесия).

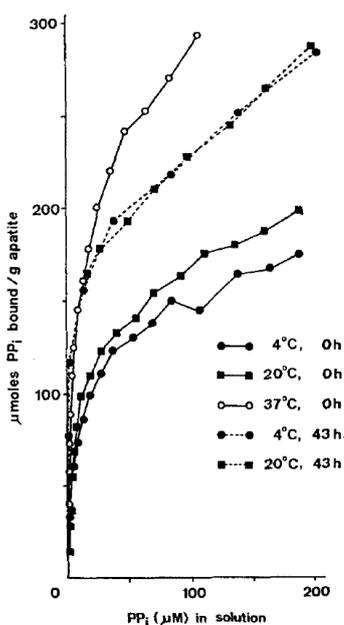


Рис 6-12. Влияние температуры и времени на связывание пирофосфата с гидроксилapatитом при рН 7.4. Замеры, выполненные сразу после добавления пирофосфата в раствор (сплошные линии), создают видимость более интенсивного связывания при высокой температуре. Однако при выдержке в 43 часа (штриховые линии) температурная зависимость отсутствует. (Для 37 °С равновесная кривая получена быть не может вследствие гидролиза пирофосфата катализируемого гидроксилapatитом).
Из работы [328]

Отметим, в силу уравнения Ван’т Гоффа, отсутствие температурной зависимости для удельного количества адсорбированного РРi означает, что энтальпийный эффект сорбции пренебрежимо мал. Тем самым движущей силой адсорбции РРi апатитом может быть только энтропийный эффект процесса.

В отдельной серии экспериментов авторы [328] исследовали влияние рН на количество адсорбированного вещества. Средство РРi к гидроксилapatиту чуть выше при рН 7.8, чем при рН 7.0, однако, в целом влияние рН оказалось несущественным.

Перераспределение ортофосфат-ионов и Ca^{2+} между кристаллами и раствором при сорбции. РРi – это единственное из интересующего нас класса соединений, для которого детально изучены как равновесные изменения состава раствора в процессе адсорбции, так и кинетика этого процесса. Данные о равновесной концентрации кальция и фосфата в растворе, сосуществующем с суспензией гидроксилapatита, адсорбировавшей различные количества РРi (через 43 часа после прибавления РРi к суспензии), полученные авторами цитированной выше работы [328], приведены в первые двух колонках Таблицы 6-2.

Таблица 6-2. Изменения концентрации кальция и ортофосфата в растворе вследствие связывания пирофосфата (РРi), этидроната (EHDP) и хлороната (Cl_2MDP) с поверхностью кристаллов апатита
Из работы [328].

Table 2. μ moles of Ca and P_i gained (+) or lost (-) by 1 g of apatite for different amounts of PP_i , EHDP and Cl_2MDP bound

μ moles bound/ g apatite	PP		EHDP		Cl_2MDP	
	ΔP	ΔCa	ΔP	ΔCa	ΔP	ΔCa
75	- 54	+52	- 86	+30	-13	+63
97	- 79	+61	- 97	+53	-23	+63
118	- 93	+68	-109	+67	-28	+58
140	-112	+67	-107	+71	—	—
161	-131	+78	-107	+70	—	—
183	-173	+89	-108	+71	—	—

Как видно из таблицы, при связывании РРi (а также обоих бисфосфонатов) с поверхностью апатита концентрация кальция в растворе уменьшается, а ортофосфата – увеличивается. Согласно оценкам авторов, количество ортофосфата, выделенного

кристаллами в раствор, возрастает при увеличении количества добавленного PPI, так что во всём диапазоне составов на каждые пять молей PPI связанного с поверхностью в раствор высвобождается примерно четыре моля ортофосфата. Количество кальция, удаляемого из раствора, тоже увеличивалось при увеличении количества добавленного PPI, но более сложным, нелинейным образом. С наибольшей скоростью количество поглощённого кальция увеличивалось в области малых концентраций PPI.

Кинетика перераспределения кальция и ортофосфата между кристаллами гидроксилapatита и раствором в процессе адсорбции PPI была детально исследована в работах [329,330,331], причём планирование экспериментов и интерпретация результатов проводились в рамках представлений о гидратированном слое (*the hydration layer*). Напомним (см. раздел 6.2), методом радиоактивных меток было установлено, что значительная часть ионов в растворе, содержащем суспензию нанокристаллического апатита, сосредоточена в тонком слое раствора вблизи поверхности кристаллов, называемом гидратированным слоем. Гидратированный слой и раствор свободно обмениваются ионами, а превращения, в которых участвует кристаллическая фаза, протекают намного медленнее. Различия в скорости массообмена между компартментами системы могут быть использованы для изучения эволюции состава компартментов, исходя из данных об изменении состава раствора со временем. Состав раствора (т.е. фильтрата) при таком подходе является величиной непосредственно измеряемой в экспериментах, а выводы о составе гидратированного слоя делаются с привлечением некоторых постулируемых моделей массообмена.

В работе [329] к суспензии гидроксилapatита, предварительно приведённой в равновесие с водным раствором содержащим CaCl_2 , NaCl , NaH_2PO_4 при pH 7.4 и температуре 22°C , добавляли радиоактивные метки $^{45}\text{Ca}^{2+}$ и(или) $^{32}\text{PO}_4^{3-}$, перемешивали суспензию 90 минут для равновесного распределения радиоактивных меток между раствором и гидратированным слоем, затем постепенно, с контролируемой скоростью приливали раствор PPI и следили за изменением специфической (для ^{45}Ca или ^{32}P) радиоактивности фильтрата со временем. Анализ результатов этих замеров показал, что добавление PPI приводит к уменьшению концентрации Ca^{2+} в растворе, подобному обнаруженному в работе [328] (показанному в Таблице 6-2), при этом *совокупная* масса кальция доступного для быстрого ионного обмена не изменяется. Последнее означает, что Ca^{2+} переходит из раствора в гидратированный слой. Также было обнаружено, что часть фосфата из гидратированного слоя переходит в раствор. Согласно полученным оценкам, связывание двух молей PPI сопровождается переходом одного моля кальция из раствора в гидратированный слой и переходом одного моля фосфата из гидратированного слоя в раствор.

Сразу отметим, в своих рассуждениях авторы [329] *постулируют*, что источником дополнительного фосфата обнаруживаемого в растворе при добавлении PPI к апатитовой суспензии может быть только гидратированный слой, поскольку процесс протекает быстро. Авторы, очевидно, упускают из виду возможность вытеснения ортофосфата пирофосфатом с поверхности кристаллов. Последний процесс, не требуя объёмной диффузии в кристалле, тоже может протекать быстро.

Для проверки того, что перераспределение кальция и фосфата между основной массой раствора и гидратированным слоем вызвано связыванием PPI с поверхностью апатита а не другим каким-то эффектом, авторы [329] добавили неорганическую пирофосфатазу (*inorganic pyrophosphatase*) к апатитовой суспензии, прореагировавшей с PPI. В результате исходное содержание Ca^{2+} в фильтрате восстановилось на 75%. Тем самым, роль PPI в перераспределении ионов была подтверждена. Для объяснения того, что концентрация Ca^{2+} восстановилась не полностью, авторы предположили присутствие нескольких (по крайней мере) двух форм PPI на поверхности кристаллов. Как полагают авторы, гидролиз

наиболее распространённой формы катализируется пирофосфатазой, а менее распространённой – нет.

Влияние PPi на состав гидратированного слоя исследовалось также в работе [330], при этом схема эксперимента была противоположной обсуждённой выше схемы [329]. Вместо добавления PPi к суспензии апатита, уравновешенной с раствором, содержащим кальций и фосфат, авторы [330] сначала приводили суспензию гидроксилapatита в равновесие с PPi , а затем добавляли радиоактивные маркеры, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ и ^{32}PPi , и следили за спадом радиоактивности фильтрата вследствие перераспределения маркеров между компартментами системы. Сравнение результатов с падением радиоактивности в аналогичных опытах с суспензией апатита в отсутствие PPi показало, что (в отличие от данных [329]) адсорбция PPi гидроксилapatитом приводит лишь к незначительному изменению количества кальция в гидратированном слое. Одновременно происходит уменьшение общего количества обмениваемого ортофосфата. Авторы приходят к выводу, что PPi занимает место ортофосфата в различных компартментах системы, не оказывая существенного влияния на кальций. Согласно их оценкам, связывание одного моля PPi сопровождается переходом в раствор двух молей ортофосфата.

Наиболее вероятную причину расхождений своих данных с результатами [329] авторы [330] видят в том, что их собственные данные характеризуют гидратированный слой после двухдневной выдержки кристаллов в растворе PPi , тогда как в [329] замеры производились непосредственно после добавления раствора PPi к суспензии гидроксилapatита. Авторы полагают, адсорбция PPi вызывает какие-то структурные изменения в гидратированном слое, развивающиеся достаточно медленно и сопровождающиеся уменьшением количества подвижного кальция.

Для проверки своей гипотезы, авторы [330] выполнили простой и остроумный эксперимент, подтвердивший связь вариаций содержания кальция в гидратированном слое со структурной перестройкой последнего. Добавив PPi и радиоактивные маркеры к суспензии гидроксилapatита, они сначала выдержали смесь в течение двух дней для достижения равновесия, отфильтровали смесь и подвергли осадок ультрацентрифугированию. Ультрацентрифугирование с ускорением 10 000 g и 80 000 g не привело к изменению активностей компонентов. Затем они выполнили аналогичные опыты, но без выдержки, отфильтровав смесь сразу после добавления PPi . Ультрацентрифугирование осадка при 10 000 g не привело к изменению активностей, однако после центрифугирования при 80 000 g активность $^{45}\text{Ca}^{2+}$ уменьшилась на треть. При этом активности $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ и ^{32}PPi остались без изменений. Из этого авторы делают вывод, что в неравновешенных суспензиях гидроксилapatита обмениваемые фосфат и PPi химически связаны с поверхностью кристалла, а обмениваемый кальций сосредоточен в гидратированном слое; после уравновешивания структура и состав гидратированного слоя меняются, и при этом кальций утрачивает подвижность.

Адсорбция PPi (а также нескольких других полифосфатов) гидроксилapatитом исследовалась в работе [331] методами сходными с использованными в обсуждавшихся выше работах [329,330]. Согласно выводам, помещённым в *the abstract*, в среднем одна молекула ортофосфата переходит в раствор на каждую молекулу полифосфата адсорбированную гидроксилapatитом. Авторы полагают, что адсорбция полифосфатов сопровождается вытеснением ортофосфата с поверхности кристаллов в раствор. Условия экспериментов, а равно и обоснованность выводов остаются не прояснёнными вследствие недоступности статьи.

Собирая вместе равновесные и кинетические данные работы [328], кинетические данные из статей [329,330], а также то, что можно извлечь из *the abstract* статьи [331], процесс адсорбции PPi апатитом (точнее, первые двое суток этого процесса) могут быть описаны следующим образом. В первые минуты после прибавления раствора PPi к суспензии гидроксилapatита, имеет место интенсивная адсорбция PPi поверхностью

кристаллов. При этом в растворе увеличивается концентрация ортофосфат-ионов, вероятно вследствие вытеснения их с поверхности кристаллов фосфатными группами PPi . Одновременно часть ионов Ca^{2+} переходит из раствора в гидратированный слой. На протяжении последующих двух дней количество PPi в растворе постепенно уменьшается, вероятно, потому что дополнительные центры адсорбции становятся доступными вследствие более упорядоченного расположения молекул PPi на поверхности кристаллов. Возможен также захват части PPi укрупняющимися кристаллами в суспензии с вхождением PPi в решётку кристалла. Концентрация Ca^{2+} в растворе остаётся низкой, а ортофосфата – высокой. В это же время адсорбция PPi инициирует некое структурное превращение в гидратированном слое, вследствие которого перешедший в него кальций утрачивает подвижность.

Указанная схема позволяет с единых позиций объяснить данные всех четырёх публикаций, однако остаются значительные расхождения оценок количества ортофосфата, вытесняемого на каждую молекулу адсорбированного PPi : 1 моль вытесняемого ортофосфата на каждые два моля сорбируемого PPi в [329], 4 моля вытесняемого ортофосфата на каждые 5 молей PPi в [328], один моль ортофосфата на каждый моль PPi в [331] и 2 моля ортофосфата на каждый моль PPi в [330]. Вероятные причины этих расхождений указаны ниже, при обсуждении механизма сорбции.

Механизм адсорбции PPi апатитом. Измеренные соотношения между количеством адсорбированного PPi и количеством ортофосфата, выделенного в раствор, свидетельствует, что встраивание фосфатных групп PPi в позиции тетраэдров PO_4 на гранях кристаллов является преобладающим механизмом сорбции. Возникает вопрос, встраивается ли при этом одна или обе фосфатные группы PPi . Из общих закономерностей сродства молекул с кислотными группами апатитом, выявленных различными методами, например *the constant composition kinetics*, известно, что молекулы с одной кислотной группой (фосфатной, фосфонатной, карбоксильной) апатитом не сорбируются, [322]. Коль скоро наличие как минимум двух кислотных групп составляет необходимое условие адсорбции, разумно предположить, что обе фосфатные группы PPi встраиваются в позиции тетраэдров PO_4 . Однако такой механизм адсорбции предполагает жёсткое геометрическое соответствие между молекулой и кристаллом и может быть осуществлён только для некоторых вполне определённых граней кристалла.

В обширной литературе, посвящённой феномену сродства PPi к поверхности апатита, сколь эти ни удивительно, нигде не упоминается вероятная роль стереохимических факторов в адсорбции. На Рис. 6-13 показана конформация пирофосфат-аниона в кристалле моноклинного четырёхводного пирофосфата кальция, $Ca_2P_2O_7 \cdot 4H_2O$. Два атома P в этом анионе отстоят друг от друга на 2.89 Å. Если угол мостикового соединения $P-O-P$, составляющий 126.3° , увеличить до 180° , не изменяя длин связей, то расстояние $P-P$ увеличится до 3.24 Å, что очень близко к половине параметра c решётки гидроксилapatита, $c/2 = 3.4$ Å. Именно на такое расстояние разнесены два тетраэдра PO_4 вдоль оси z в решётке.

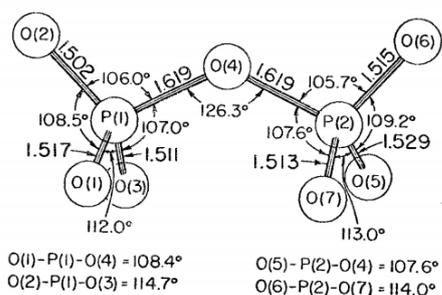


Рис 6-13. Длины и углы связей пирофосфат-аниона в кристаллическом четырёхводном пирофосфате кальция, $Ca_2P_2O_7 \cdot 4H_2O$. Из диссертации [332].

Возникает вопрос, возможна ли деформация пирофосфат-аниона, позволяющая разместить две его фосфатные группы в соседних позициях тетраэдров PO_4 решётки? Беглый обзор кристаллических структур десяти выбранных наугад неорганических пирофосфатов (коих описания доступны через интернет): $\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaNaP}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgAl}_2\text{P}_2\text{O}_7$, низкотемпературный ромбический ZrP_2O_7 , WP_2O_7 , $\text{Sr}_2\text{Mn}[\text{PO}_4][\text{P}_2\text{O}_7]$, $\text{Na}_6\text{Cu}[\text{P}_2\text{O}_7]_2 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}_3(\text{P}_2\text{O}_7)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ – даёт утвердительный ответ. Группа P_2O_7 обладает высокой степенью вариативности. В указанных структурах длина мостиковой связи $\text{P}-\text{O}$ варьирует от 1.51Å до 1.70Å ; угол $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ изменяется от 97.4° до 152.4° . Имеется также класс соединений, кристаллизующихся в структурном типе кубического ZrP_2O_7 . Угол $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ в этой группе равен 180° , однако соединения эти устойчивы лишь при высокой температуре, [333]. Если, ограничиваясь низкотемпературными фазами, допустить максимальное измеренное значение длины связи $\text{P}-\text{O}$, равное 1.70Å , и максимальное значение угла $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, 152.4° , то межатомное расстояние $\text{P}-\text{P}$ в точности совпадает с величиной $c/2$ гидроксилapatита, 3.4Å . Таким образом, возможность размещения обеих фосфатных групп PPi в двух соседних позициях тетраэдров PO_4 , разнесённых на расстояние $c/2$, сомнений не вызывает. Ось удлинения молекулы при таком размещении ориентирована параллельно оси z кристалла. Тем самым, сорбирующая грань должна быть параллельна оси z , т.е. это грань призмы.

Возможность замещения двух тетраэдров PO_4 в структуре апатита одной группой P_2O_7 подтверждается также спектроскопическими исследованиями. Конденсация двух фосфатов с образованием пирофосфата действительно была обнаружена в кристаллах природного (абиогенного) апатита, сначала с помощью ИК-спектроскопии [334,335], а затем, независимо, методами ЯМР [336].

Важно оговориться, предлагаемый здесь способ размещения молекулы пирофосфата на грани гексагональной призмы кристалла апатита не является единственно возможным. Сходные размещения возможны и для некоторых «наклонных» граней апатита. Однако в предшествующем разделе было указано, что сорбирующие грани используемого в опытах нанокристаллического апатита – это всегда грани гексагональной призмы (и именно на таких гранях развивается гидратированный слой).

Возвращаясь к обсуждению работ [329-331], посвящённых кинетике массообмена между раствором и суспензией, отметим прежде всего, что эти данные не оставляют сомнения в том, что адсорбция PPi апатитом протекает при активном участии гидратированного слоя и сопровождается структурной перестройкой последнего. Напомним, непосредственно после добавления PPi часть ионов Ca^{2+} из раствора переходит в гидратированный слой, спустя два дня эти ионы утрачивают подвижность. На мой взгляд, проще всего это явление объяснить, предположив, что в результате адсорбции гидратированный слой локально преобразуется в апатит. Приток ионов кальция из раствора необходим, потому что отношение Ca/P в апатите выше (в апатите $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$, а в гидратированном слое $\text{Ca}/\text{P} = 1.52$). Содержащиеся в гидратированном слое молекулы воды при этом должны переходить в раствор, поскольку в апатите кристаллизационная вода отсутствует. Тем самым общее число подвижных частиц в системе увеличивается. Соответствующий энтропийный эффект, вероятно, и является движущей силой процесса.

Выше отмечалось, что авторы [329-331] сообщают сильно различающиеся значения для количества ортофосфата, вытесняемого с поверхности апатита на каждую молекулу сорбируемого PPi : от 1 моля ортофосфата на 2 моля PPi до 2 молей ортофосфата на 1 моль PPi . Можно предложить по крайней мере два объяснения этих расхождений. Прежде всего, обращает на себя внимание тот факт, что авторы указанных публикаций никак не охарактеризовали степень отклонения использованного ими гидроксилapatита от стехиометрии. Все четыре исследования были выполнены в начале 1970-х, когда связь вариаций отношения Ca/P со свойствами поверхности гидроксилapatита ещё не была осознанна. Авторы обсуждаемых публикаций (возможно за исключением недоступной мне статьи [330]) в экспериментах использовали реактив гидроксилapatит, поставляемый

различными фирмами. О возможном отклонении этого продукта от стехиометрии можно только догадываться. Современные исследователи получают гидроксилapatит (и другие формы апатита) самостоятельно, в тщательно контролируемых условиях. Если апатит, использованный в опытах, имел разную степень нестехиометрии, то и количество ортофосфата, вытесняемого в раствор на каждую молекулу сорбируемого PPi , должно отличаться. В самом деле, встраивание фосфатной группы PPi в позицию тетраэдра PO_4 апатита должно приводить к вытеснению ортофосфата в раствор, *только* если эта позиция не была вакантной.

Изменения количества вытесняемого с поверхности ортофосфата также могут быть объяснены одновременным действием двух (или более) механизмов адсорбции. Напомним, авторы [329] высказали предположение о наличии двух форм PPi на поверхности апатита потому, что в их опытах обработка суспензии гидроксилapatита, адсорбировавшей PPi , щелочной фосфатазой восстановила исходную концентрацию Ca^{2+} в растворе, но лишь на 75%. Этот результат согласуется с выводами авторов [115], обнаруживших, что лишь 82% PPi адсорбированного гидроксилapatитом энзиматически гидролизуются пирофосфатазой (остальной PPi может быть гидролизован лишь после растворения кристаллов кислотой). Форма PPi , химически связанная с поверхностью апатита и устойчивая к действию фосфатаз действительно может быть получена в реакции трансфосфорилирования, катализируемой апатитом, исследованной в [115]. В реакции конечная фосфатная группа АТФ ковалентно связывается с ортофосфатом на поверхности апатита с образованием PPi (см. обсуждение в разделе 5.3.2., посвящённом каталитической активности апатита).

Помимо описанного в данном разделе, есть и другие способы модифицирования поверхности апатита пирофосфатом. Выше, в разделе 5.3.2, уже упоминалась реакция трансфосфорилирования гидроксилapatита АТФ или АДФ, катализируемая гидроксилapatитом, протекающая с образованием пирофосфата, связанного с поверхностью минерала. Механизм связывания этого PPi принципиально отличается от адсорбции описанной выше, поскольку гидролиз его не катализируется пирофосфатазами. Кроме того, в работе [337] описан метод обработки гидроксилapatита пирофосфорной кислотой, в результате которой поверхность минерала покрывается «разветвлёнными цепями пирофосфатов». Никаких пояснений *the abstract* к сожалению не содержит.

6.3.2. Адсорбция пероксидифосфата гидроксилapatитом.

В работе [338] изучено взаимодействие поверхности гидроксилapatита с пероксидифосфатом (PDP), аналогом пирофосфата, в меньшей степени подверженного гидролизу и потому потенциально применимому для регулирования процессов кальцинирования тканей.

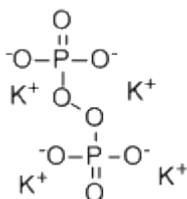


Рис 6-14. Пероксидифосфат калия.

Согласно информации, довольно скудной, помещённой в *the abstract*, PDP обнаруживает высокое сродство к гидроксилapatиту, однако последний катализирует гидролиз PDP. Авторы изучали адсорбцию PDP гидроксилapatитом при 4° и 37°С в присутствии ионов фосфата. Согласно их выводам, имеет место конкуренция между PDP и фосфатом за одни и те же центры адсорбции. Оценка термодинамических параметров показала, что реакция эндотермическая. Энтропия, тем самым, является единственной движущей силой процесса адсорбции.

6.3.3. Адсорбция бисфосфонатов апатитом.

Речь в данном подразделе идёт об особом классе бисфосфонатов именуемых двойными бисфосфонатами (*geminal bisphosphonates*), представляющих собой аналоги пирофосфата (PPi), в которых две фосфонатные группы соединяются через атом углерода, Рис. 6-10. Многие бисфосфонаты этого класса, подобно, обладают высоким сродством к поверхности апатита, в частности, к минералу костной ткани, но, в отличие от PPi, не склонны к гидролизу, в том числе энзиматическому. Благодаря этим свойствам бисфосфонаты находят широкое применение в медицине для замедления процессов резорбции костной ткани при таких заболеваниях как остеопороз, *Paget's disease*, метастазы костей.

Фармакологические применения стимулировали многочисленные замеры степени сродства бисфосфонатов к гидроксилapatиту и карбонатизированному гидроксилapatиту, основанные на способности этих молекул замедлять нуклеацию, рост, агрегирование и растворение кристаллов апатита, см. обзоры [339,340], а также работы [324,321,325] и содержащиеся в них ссылки. Степень сродства различных бисфосфонатов к апатиту также исследовалась в хроматографической колонке с гидроксилapatитом в качестве сорбента, [326]. На основании этих данных были выявлены эмпирические закономерности, связывающие степень сродства молекулы к апатиту с её структурой, позволившие создать бисфосфонатные препараты, способные годами удерживаться в связанном состоянии на поверхности биоapatита кости в теле человека.

Установлено, что наличие обеих фосфонатных групп является непременным условием активного связывания молекулы с поверхностью минерала, т.е. монофосфонаты значительного сродства не обнаруживают. Сродство бисфосфоната к апатиту в основном определяется группой R_1 на атоме углерода; наибольшее сродство наблюдается, когда эта группа представляет собой гидроксил (ОН). В то же время, боковая цепь R_2 , в меньшей степени влияя на способность молекулы к связыванию с апатитом, модифицирует биохимическую активность препарата и существенно влияет на способность бисфосфоната подавлять резорбцию кости. (Современные представления о биохимических механизмах действия фосфонатов и захватывающие исторические подробности их применения, от химического оружия и мрачных тайн ВПК через пестициды к химиотерапии, изложены в превосходно оформленной диссертации [341]).

На протяжении ряда лет эмпирические закономерности сродства бисфосфонатов к апатиту объяснялись исходя из традиционных «хелатных» представлений о взаимодействии органических молекул с апатитом. Ведущая роль в хемосорбции отводилась т.н. *backbone* O–P–C–P–O молекулы, [340]. Предполагалось, что в случае, когда боковая цепь R_1 представляет собой гидроксил, концевые атомы кислорода, дополненные гидроксильной группой посередине подобно трезубцу (*the trident effect*) вписываются в атом кальция на поверхности кристалла. Эти представления, однако, не были подкреплены спектроскопическими или детальными физико-химическими исследованиями.

Начиная с середины 2000-х гг. обозначился новый тренд в исследованиях бисфосфонатов. С расширением списка изученных соединений были открыты такие виды их физиологической активности, как способность подавлять развитие ряда паразитических одноклеточных эукариотов и некоторых бактерий, убивать опухолевые клетки, активировать $\gamma\delta$ T-клетки иммунной системы, в свою очередь подавляющих опухолевые клетки. Тем самым обнаружилось новые возможности применений бисфосфонатов в медицине, для которых высокое сродство к минералу кости крайне нежелательно (см. ссылки в работах [342,343]). В итоге вновь во всей остроте был поставлен вопрос о механизме связывания бисфосфонатов с биоapatитом.

В поисках ответа, в 2005-2009 гг. адсорбция ряда бисфосфонатов гидроксилapatитом и биоapatитом была исследована методами спектроскопии ЯМР и калориметрического

титрования, [342-344]. В результате была предложена новая концепция о механизме адсорбции, согласно которой фосфонатные группы связываются с кальцием апатита, вытесняя отофосфат-анионы с поверхности кристаллов. Предложенный механизм связывания, сугубо энтропийной природы, никак с образованием хелатов не связан. Однако при ближайшем рассмотрении в рассуждениях авторов [342-344] обнаруживаются пробелы. К тому же современные авторы не принимают к сведению более ранние данные, полученные в 1970-х. Ниже сделана попытка уточнить модель адсорбции бисфосфонатов апатитом, исходя из всей совокупности имеющихся данных.

Физико-химические данные. Выше, в разделе 6.3.1, нами уже обсуждалась работа [328], в которой выполнено сравнительное исследование адсорбции пирофосфата (PPi) и двух бисфосфонатов, хлордроната и этидроната (показанных на Рис. 71 под номерами 10 и 9, соответственно), суспензией синтетического гидроксилapatита. Наиболее детально ими был исследован PPi. Для хлордроната и этидроната авторами изучена кинетика адсорбции и сопутствующие вариации состава раствора, построены изотермы адсорбции при 20° С. Кроме того, ими исследована конкуренция между этидронатом и PPi при их совместной адсорбции апатитом.

В целом, выявленные в [328] особенности адсорбции хлордроната и этидроната оказались сходными с таковыми для PPi. Кинетические опыты показали, что, подобно PPi, адсорбция обоих бисфосфонатов протекает наиболее интенсивно в течение первого часа после добавления их к суспензии, затем резко замедляется, а равновесная поверхностная концентрация адсорбата достигается примерно за 43 часа. Как и в случае с PPi, адсорбция хлордроната и этидроната гидроксилapatитом сопровождается уменьшением концентрации кальция в растворе и увеличением концентрации ортофосфата, см. Таблицу 6-2.

Построенные в [328] изотермы адсорбции показаны на Рис. 6-15. Как можно видеть, количество адсорбата на единицу массы апатита уменьшается в последовательности PPi > этидронат > хлордронат, соответствующей увеличению размеров молекулы. Это опять-таки согласуется с предположением об использовании всеми тремя молекулами одних и тех же центров адсорбции на поверхности кристалла.

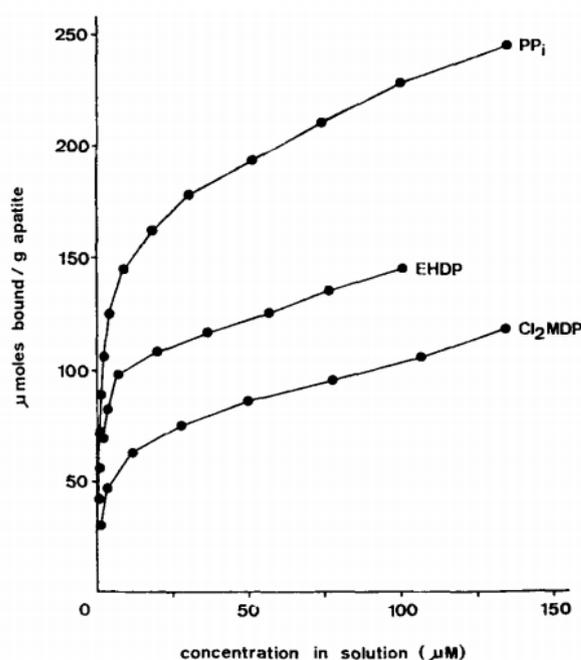


Рис 6-15. Связывание пирофосфата (PPi), этидроната (EHDP) и хлордроната (Cl₂MDP) с поверхность мелкокристаллического гидроксилapatита при 20° С и рН 7.4 после 43-часовой выдержки суспензии. По горизонтальной оси отложены концентрации, соответственно, PPi, EHDP и Cl₂MDP в растворе. Из работы [328].

В отдельной серии экспериментов авторы [328] исследовали взаимное влияние РРi и этидроната при сорбции. При добавлении эквимольных количеств РРi и этидроната к суспензии гидроксилapatита, количество адсорбированного вещества уменьшается для обеих молекул, но этидронат оказывается более эффективным ингибитором сорбции, чем РРi. На каждый μmole этидроната, связанного с поверхностью, количество адсорбированного РРi уменьшается на $1.5 \mu\text{mole}$. В то же время, на каждый μmole связанного с поверхностью РРi, количество адсорбированного этидроната уменьшается только на $0.4 \mu\text{mole}$. Полученные результаты согласуются с предположением о конкуренции между РРi и этидронатом за центры связывания на поверхности гидроксилapatита, в которой имеющий более крупную молекулу бисфосфонат характеризуется также и более высоким сродством к поверхности.

К сожалению, работа [328] – это единственный пример исследования адсорбции бисфосфонатов апатитом, в котором измерены сопутствующие изменения содержаний, как кальция, так и фосфата в растворе. Было выполнено несколько исследований адсорбции бисфосфонатов, в которых измерены сопутствующие вариации содержания фосфата в растворе. Во всех случаях отмечается увеличение концентрации фосфата в растворе при адсорбции. В [344] методом ЯМР обнаружено выделение фосфата в раствор при адсорбции золедроната (показан под номером 3 на Рис. 6-18) синтетическим гидроксилapatитом; тем же методом в [342] обнаружено выделение фосфата при адсорбции биоapatитом кости шести бисфосфонатов: алендроната, памидроната, золедроната, ризедроната, дезоксиризедроната и орто-ризедроната, показанных под номерами 1, 2, 3, 5, 6 и 7, соответственно, на Рис. 6-18. Выделение фосфата в раствор также обнаружено в [345] при исследовании адсорбции бисфосфоната тилудроната, Рис. 6-16, нанокристаллическим гидроксилapatитом.

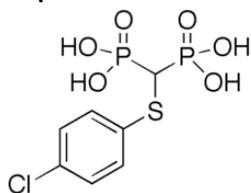


Рис 6-16. Тилудроновая кислота

Далее, в силу принципа Ле Шателье, возрастание концентрации ортофосфата в растворе при адсорбции бисфосфонатов гидроксилapatитом означает, что повышение концентрации ортофосфата в растворе, в свою очередь, должно способствовать десорбции бисфосфонатов. Примечательно, что именно это и наблюдалось в экспериментах, выполненных в [326]. Авторы, на примере золедроната, ризедроната, дезоксиризедроната, орторизедроната (показанные под номерами, соответственно, (3), (5), (4), (7) на Рис. 6-18), соединения NE10790, являющегося фосфонокарбоксилатным аналогом ризедроната, Рис. 6-17, а также некоторых других, исследовали возможность использования апатитовой хроматографии для количественной оценки степени сродства бисфосфонатов к апатиту. Согласно их данным, указанные соединения могут быть смыты (*eluted*) ортофосфатом с гидроксилapatитового сорбента в хроматографической колонне подобно кислотным белкам, с той лишь разницей, что для смыва требуются более высокие концентрации ортофосфата.

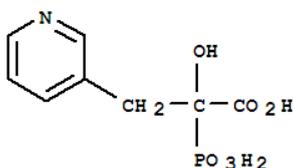


Рис 6-17. Соединение NE10790, фосфонокарбоксилатный аналог ризедроната (следует сравнить с (5) на Рис. 6-18).

Таким образом, обнаруженное в [328] возрастание концентрации ортофосфата в растворе в процессе адсорбции бисфосфонатов подтверждается независимыми исследованиям [326, 342, 344, 345]. Однако обнаруженное в [328] уменьшение концентрации кальция в растворе при адсорбции двух бисфосфонатов гидроксилapatитом независимых подтверждений пока не получило, поскольку другими авторами концентрация этого катиона не контролировалась.

Отметим, обнаруженное в [328] уменьшение концентрации кальция и увеличение концентрации фосфата в растворе в процессе адсорбции хлороната и этидроната гидроксилapatитом имело бы большое практическое значение, если бы фармакологи уделили ему внимание. В самом деле, согласно принципу Ле Шателье, повышенные концентрации кальция должны способствовать удержанию молекул на поверхности кристаллов, а повышенные концентрации фосфатов должны способствовать десорбции. Молекулы бисфосфонатов способны удерживаться в адсорбированном состоянии в костях на протяжении многих лет вследствие сравнительно высокой концентрации кальция в биологических жидкостях, и низкой концентрации фосфата. Используемые бисфосфонаты, в частности, должны быть малоэффективны при гиперфосфатемии и более эффективны при гиперкальциемии.

Выше уже упоминалось сходство в поведении PPI и бисфосфонатов при сорбции и признаки конкуренции между этими молекулами за одни и те же центры адсорбции, обнаруженные в работе [328], наводящие на мысль о единстве механизма адсорбции молекул с фосфатными и фосфонатными группами. Интересно отметить, что и карбоксильные группы, вероятно, взаимодействуют с теми же центрами адсорбции на поверхности апатита. Если, например, одну фосфонатную группу в ризедронате, (бисфосфонат, обнаруживающий наибольшее сродство к апатиту) заменить на карбоксильную группу с образованием соединения NE10790, Рис. 6-17, то, согласно [326], сродство молекулы к апатиту несколько уменьшается, но не исчезает (что имело бы место при переходе от бисфосфонатов к монофосфонатам). Это наводит на мысль, что механизм взаимодействия фосфонатных и карбоксильных групп с поверхностью минерала один и тот же.

К выводу о сходстве механизмов адсорбции PPI, бисфосфонатов и цитрата пришли также и авторы [346], исследовавшие влияние пирофосфата натрия, ряда бисфосфонатов (метилен-дифосфоновая кислота, этидронат, алендронат) и некоторых других соединений на адсорбцию лимонной кислоты гидроксилapatитом. Согласно их данным, при добавлении пирофосфата или бисфосфонатов к суспензии гидроксилapatита, предварительно обработанной лимонной кислотой и адсорбировавшей максимальное её количество, происходит количественное вытеснение лимонной кислоты в раствор. Исследовав кинетику этого процесса, авторы заключили, что имеет место конкуренция между цитратом и добавленными молекулами (пирофосфатом или бисфосфонатом) за одни и те же центры адсорбции.

Ещё одна особенность адсорбции бисфосфонатов проявляется при использовании различных разновидностей апатита в качестве сорбента. Пик исследовательской активности бисфосфонатов совпал по времени с осознанием сообществом медиков и биохимиков факта, который был известен минералогам по крайней мере с 1960 г. – что атрибуция минерала кости как гидроксилapatита в значительной мере произвольна [322]. Вопрос об истинной природе этого сложнейшего образования всё ещё дискутируется, [348], и мы не станем здесь его обсуждать. В течение ряда лет было принято считать, что, в первом приближении, минерал кости может быть представлен как плохо-окристаллизованный нанокристаллический гидроксилapatит с дефицитом кальция, в котором часть анионов PO_4^{3-} замещена на HPO_4^{2-} и CO_3^{2-} , [289]. (Эта точка зрения несколько устарела; в действительности некоторые разновидности биоapatита вовсе не содержат гидроксильных групп.) Более полное понимание природы биоapatита вызвало к жизни исследования сродства бисфосфонатов к синтетическому апатиту, по своим

свойствам напоминающему биоапатит. Было изучено средство бисфосфонатов к нанокристаллическому гидроксилapatиту [345], к гидроксилapatиту с дефицитом кальция [344], к карбонатизированному гидроксилapatиту [325]. Выполненные исследования прояснили некоторые новые детали взаимодействия бисфосфонатов с апатитом, важные для фармакологии, но не привели к пересмотру картины сложившейся ранее, на основе данных, полученных с использованием гидроксилapatита. По всей видимости, такие вариации апатита, как отклонения от стехиометрии, частичное замещение фосфата на карбонат, нанокристаллическая текстура образцов не изменяют механизма связывания бисфосфонатов с апатитом.

Спектроскопические данные. В работе [344] исследованы спектры ЯМР на ядрах ^{31}P суспензий нанокристаллического кальций-дефицитного гидроксилapatита в водных растворах золедроната. Авторы пришли к выводу, что при хемосорбции этого бисфосфоната гидроксилapatитом фосфонатные группы сорбируемых молекул замещают ортофосфат-анионы на поверхности минерала. Ортофосфат при этом переходит в раствор. Подробности, увы, прояснены быть не могут, поскольку мне доступен лишь *the abstract* этой статьи.

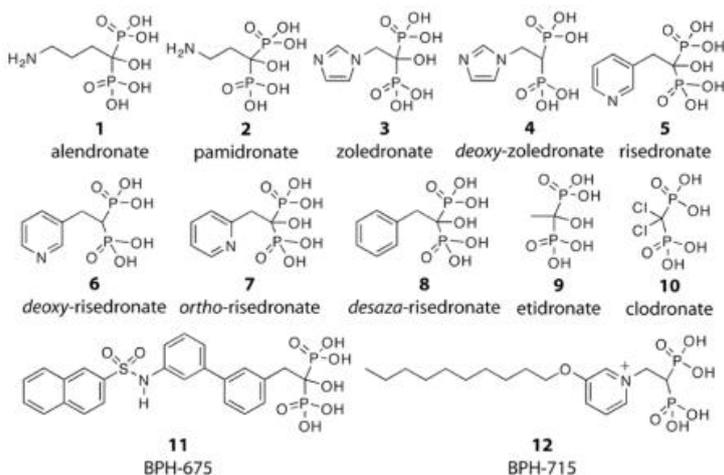


Рис 6-18. Бисфосфонаты исследованные в [342,343].

В 2008-2009 гг. детальное исследование механизма адсорбции бисфосфонатов апатитом было предпринято авторами [342,343]. В первой из двух работ изучались спектры ЯМР на ядрах ^2H , ^{13}C , ^{15}N и ^{31}P для памидроната, ризедроната, золедроната, аледроната, дезоксиризедроната и орторизедроната (показанных на Рис. 6-18 под номерами 2, 5, 3, 1, 4 и 7, соответственно), адсорбированных минералом кости. Объектом исследования служили измельчённые кости человека, погибшего в Лос-Анжелесе от огнестрельных ран, выдержанные в растворах указанных бисфосфонатов, различной концентрации.

Анализ ЯМР-спектров над-остаточной жидкости на ядрах ^{31}P показал, что связывание бисфосфонатов с поверхность минерала сопровождается выделением фосфата в раствор. В среднем связывание ~ 1.25 молекул бисфосфоната сопровождается выделением одной молекулы фосфата в раствор. Для связанных с костью бисфосфонатов анализ спектров на тех же ядрах привел авторов к выводу о наличии прочной связи молекул бисфосфонатов с поверхностью, вследствие которой фосфонатные группы утрачивают способность к вращению.

Кроме того, авторы смогли, на основании данных ЯМР на ядрах ^{31}P , построить изотерму адсорбции памидроната и оценить его поверхностную плотность при концентрации насыщения, оказавшуюся равной $30\text{-}38 \text{ \AA}^2$ на одну молекулу. Последнее

значение близко к двумерной плотности кристаллического памидроната, 40 \AA^2 на молекулу, оцененной авторами по рентгеноструктурным данным. Тем самым, молекулы бисфосфоната располагаются плотным монослоем по всей или большей части поверхности кристаллов.

На примере золедроната и ризедроната, авторы [342] изучали вопрос о том, как протонирование боковой цепи R_2 влияет на взаимодействие бисфосфоната с поверхностью кристалла. Ими обнаружены существенные изменения в спектрах ^{15}N ризедроната при изменении pH. Согласно их выводам, пиридиновое кольцо адсорбированного ризедроната активно взаимодействует с отрицательно заряженными анионами поверхности кристалла при pH 4.0. При pH 6.0 взаимодействие значительно ослабляется, но тем не менее отчетливо просматривается в спектрах. При pH 8.0 признаки взаимодействия в спектрах отсутствуют. В то же время, изменение pH не приводит к изменениям в спектрах ^{15}N золедроната. Его имидазольное кольцо интенсивно взаимодействует с поверхностью минерала при всех значениях pH.

Указанные различия в поведении боковых цепей R_2 золедроната и ризедроната авторы объясняют отличием величины pK_a . Поскольку для пиридинового кольца ризедроната $pK_a \sim 5.7$, оно должно быть протонировано при pH 4.0, частично протонировано при pH 6.0 и не протонировано при pH 8.0. С другой стороны, для имидазольного кольца золедроната величина $pK_a \sim 6.7$ предполагает высокую степень протонирования, и тем самым интенсивное взаимодействие с поверхностью, при всех исследованных значениях pH.

Отметим, положительная корреляция между интенсивностью взаимодействия боковой цепи R_2 бисфосфоната с поверхностью и степенью её протонирования предполагает, что поверхность кристалла несёт отрицательный заряд. Имеется обширная литература, посвящённая электрофоретическим оценкам поверхностного заряда нанокристаллического апатита. Примечательно, что в указанном диапазоне pH, согласно этим замерам, поверхность гидроксилapatита действительно несёт отрицательный заряд.

Далее, авторы сумели (из спектров ЯМР) оценить расстояние C(1)–N для адсорбированного памидроната, и это позволило им определить конфигурацию молекулы. В кристаллическом натровом памидронате боковая цепь имеет близкую к *trans* конфигурацию C(1)–C(2)–C(3)–N, однако расстояние C(1)–N для адсорбированного минералом кости памидроната свидетельствует о конфигурации *gauche*. Предложенная ими модель адсорбированной молекулы представлена на Рис. 6-19.

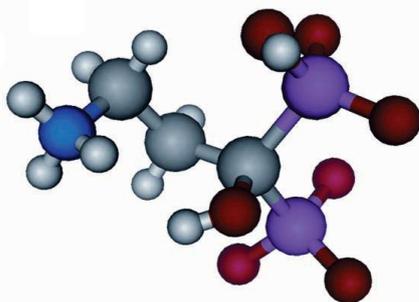


Рис 6-19. Конформация памидроната адсорбированного костью, по данным спектроскопии ЯМР. (NMR derived structure of pamidronate on bone. The side chain (C₁–C₂–C₃–N) torsion angle is ± 71 – 77° ; $d = 3.2 \text{ \AA}$).
Из работы [342]

«Скрюченную» *gauche*-конформацию молекулы авторы объясняют тем, что одна из её фосфонатных групп, вероятно, фиксирована в позиции тетраэдра PO_4 решётки апатита, в то время как (протонированная) положительно заряженная группа $-\text{CH}_2 - \text{NH}_3^+$ притянута к отрицательно заряженной поверхности минерала.

Авторы [342] также исследовали спектры ЯМР для помеченных дейтерием памидроната, алендроната, золедроната и ризедроната. При 30° C , в спектрах всех четырёх адсорбированных молекул были обнаружены признаки быстрых, но

пространственно-ограниченных колебательных движений, не обнаруживаемых в спектрах соответствующих чистых кристаллов. По охлаждению до -50°C колебания эти сходят на нет.

К сожалению, спектры ЯМР на ядрах ^{31}P фосфонатных групп адсорбированных молекул оказались неотличимы от аналогичных спектров ортофосфатных групп апатита. По этой причине механизм адсорбции бисфосфонатов апатитом не может быть однозначно определён из данных о ЯМР-спектрах, полученных в [342]. Нельзя даже определить, одна или обе фосфонатные группы молекулы участвуют в связывании её с кристаллом.

Данные калориметрии. Изотермическое калориметрическое титрование (*isothermal titration calorimetry*, ИТС) – это метод термодинамического исследования взаимодействий молекул в растворах, хорошо себя зарекомендовавший при исследовании механизмов связывания белков с лигандами, [347]. Реагенты смешиваются и реагируют в ячейке, при этом энтальпийный эффект (ΔH) протекающей реакции измеряется непосредственно, а приращения свободной энергии (ΔG) и энтропии (ΔS) рассчитывается из известного соотношения (У)

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{У})$$

(в предположении, что в ячейке достигнуто равновесие, и концентрации компонентов соответствуют константе ассоциации K_a).

С целью дальнейшего прояснения механизма адсорбции, авторы [343] провели изотермическое калориметрическое титрование (при 37°C) суспензии кости растворами всех 12-ти бисфосфонатов показанных на Рис. 6-18. Полученные ими концентрационные зависимости энтальпии адсорбции приведены на Рис. 6-20. На основании этих данных авторами были оценены значения свободной энергии (ΔG) и энтропии (ΔS) адсорбции.

Прежде чем переходить к обсуждению полученных авторами [343] результатов, отметим что данные оценки термодинамических параметров заведомо характеризуют лишь самую раннюю стадию процесса адсорбции. Кинетические кривые адсорбции, построенные в упоминавшейся выше работе [328], показывают, что для достижения равновесия требуется около 43 часов, тогда как при калориметрическом титровании на это отводится не более 10 минут.

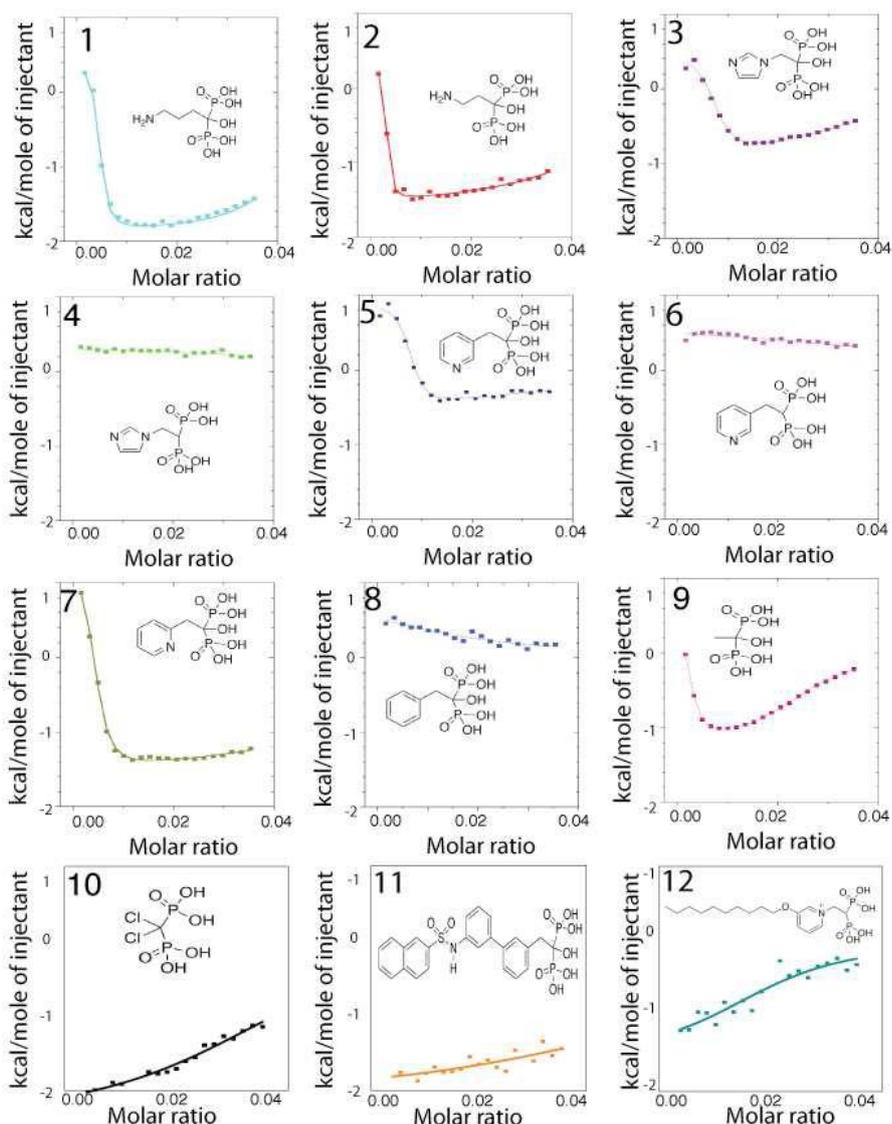


Рис 6-20. Результаты изотермического калориметрического титрования суспензии биоапатита кости бисфосфонатами. По горизонтальной оси отложены молярные отношения апатит/бисфосфонат, рассчитанные в предположении, что кость на 60% состоит из биоапатита.

Из Supporting Information [349] к работе [343].

Авторы [343] разбили полученные ими кривые ИТС на две группы. В первую вошли кривые, показанные на Рис. 6-20 под номерами 1, 2, 3, 5, 7 и 9, которые могли быть описаны лишь в предположении сосуществования двух механизмов связывания молекулы бисфосфоната с поверхностью минерала, обозначенные (на примере памидроната) на Рис. 6-21 как “site A” и “site B”. Кривые ИТС остальных шести бисфосфонатов, отнесённых во вторую группу, могли быть описаны в предположении единого механизма адсорбции “site A”.

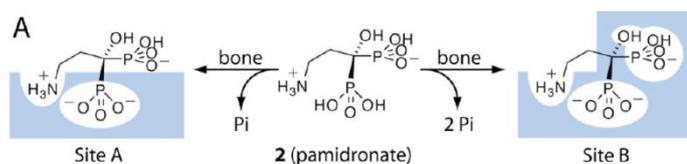


Рис 6-21. Схематическое изображение двух механизмов связывания памидроната с биоапатитом кости, постулированных в [343]. (*Site A*) – слабосвязанное состояние, с высокой заселённостью, наблюдаемое для всех бисфосфонатов; (*Site B*) – сильносвязанное состояние с низкой заселённостью, наблюдаемое только для бисфосфонатов содержащих группу OH.

Из работы [343].

Конфигурация А характеризуется высокой заселённостью и низкой величиной свободной энергии связывания. Именно эта конфигурация, полагают авторы, видна на спектрах ЯМР, обсуждавшихся выше. Конфигурация В имеет низкую заселённость и почти вдвое большее значение ΔG . Конфигурация В, обнаруживаемая только для бисфосфонатов, в которых группа R_1 представляет собой гидроксил (ОН), на спектрах ЯМР не проявляется вследствие низкой заселённости. Средние значения ΔG образования комплекса А и В составляют, соответственно, -5.2 kcal и -8.5 kcal.

Весьма примечательно, что обе конфигурации стабилизируются энтропийным, а не энтальпийным эффектом, т.е. для обеих конфигураций $\Delta G \approx -T\Delta S$. При этом энтропийные эффекты реакций образования комплексов А и В, оцененные для разных бисфосфонатов, оказались близки: для слабосвязанной конфигурации А, ΔS составляет $14 \text{ calK}^{-1}\text{mole}^{-1}$, а для сильносвязанной ΔS примерно вдвое больше, $30 \text{ calK}^{-1}\text{mole}^{-1}$.

Авторы [343] предлагают следующее объяснение найденных закономерностей: как слабосвязанная (*site A*), так и сильносвязанная (*site B*) конфигурации возникают вследствие замещения фосфатных групп фосфонатными на поверхности апатита. Движущей силой обоих процессов является энтропийный эффект, возникающий за счёт высвобождения ортофосфата в раствор. Они полагают, слабосвязанная конфигурация А возникает вследствие замещения одного ортофосфата на фосфонатную группу, а при образовании сильносвязанной конфигурации В обе фосфонатные группы молекулы замещают ортофосфаты в решётке. Поскольку при связывании по первому механизму в раствор переходит один ортофосфат, а при втором – два, то и энтропийный эффект во втором случае примерно вдвое выше.

Предложенная авторами [343] интерпретация их термодинамических данных вызывает ряд вопросов. Прежде всего, адсорбция с образованием *site A* по такому механизму должна приводить к высвобождению лишь одной ортофосфатной группы в раствор. Положительный энтропийный эффект от высвобождения ортофосфата при этом должен компенсироваться отрицательным эффектом происходящим от того, что молекула бисфосфоната, связываясь с поверхностью, утрачивает подвижность. Кроме того авторы не учитывают, что адсорбция бисфосфонатов сопровождается переходом части ионов Ca^{2+} из раствора в гидратированный слой, и это должно приводить к уменьшению энтропии. Если бы связывание посредством встраивания одной фосфонатной группы в позицию PO_4 апатита (с образованием *site A*) было возможно, то аналогичный процесс был бы осуществим и для монофосфонатов, чего не наблюдается. Известно, что монофосфонаты апатитом не сорбируются. Тем самым, энтропийный эффект от высвобождения ортофосфата не может быть главной движущей силой адсорбции с образованием *site A*. Далее, согласно функции распределения Больцмана, более стабильная конфигурация *site B* в условиях термодинамического равновесия характеризуется более высокой заселённостью, тогда как у авторов [343] всё в точности наоборот – менее стабильная конфигурация *site A* многократно преобладает над *site B*.

Поскольку предложенная авторами [343] модель адсорбции не объясняет описанных ими явлений, возникает вопрос о причинах, побудивших их постулировать сосуществование двух видов адсорбции. Очевидно, при связывании молекулы обеими фосфонатными группами с образованием *site B*, общее число подвижных частиц в системе действительно увеличивается, и происходящий отсюда энтропийный эффект действительно мог стать движущей силой процесса адсорбции.

Из рассмотрения материалов, помещённых как *Supporting Information* [349] на сайте журнала опубликовавшего статью, следует, что авторы использовали пакет программного обеспечения [347], основанный на формализме уравнения (У). Иначе говоря, авторы [343] описали адсорбцию, как если бы поверхность апатита была макромолекулой, а бисфосфонат – лигандом. В действительности такой подход вполне правомочен в области малых концентраций адсорбата, где можно предполагать отсутствие взаимодействия

между адсорбированными молекулами. Тем самым, вывод авторов о том, что энтропия является главной движущей силой процесса адсорбции бисфосфонатов апатитом, представляется обоснованным, по крайней мере в области малых концентраций бисфосфоната. Однако в области более высокой концентрации, вследствие взаимодействия между адсорбированными молекулами, химический потенциал адсорбата не может быть описана логарифмической функцией его поверхностной концентрации. Поэтому оценки ΔS и ΔG для сильно связанного состояния *site B* вызывают сомнения.

Механизм хемосорбции. Сходство изотерм адсорбции хлороната и этидроната апатитом с аналогичной изотермой PPI, сходство данных по кинетике адсорбции, тот факт, что, в полной аналогии с PPI, адсорбция бисфосфонатов тоже сопровождается возрастанием концентрации ортофосфата в растворе и уменьшением концентрации кальция, указывает на сходство механизмов адсорбции, очевидно, проистекающее из структурного сходства молекул пирофосфата и бисфосфоната. Поскольку, как уже было упомянуто, монофосфонаты апатитом не сорбируются, вероятно участие обеих фосфонатных групп в связывании молекулы с поверхностью кристалла. В этой связи представляется знаменательным, что стереохимическое соответствие, обсуждавшееся выше для PPI (раздел 6.3.1), имеет место и для бисфосфонатов.

Напомним, расстояние между двумя атомами P в группе P_2O_7 близко к расстоянию между двумя атомами P в тетраэдрах PO_4 (вдоль оси z кристалла) апатита, когда угол мостикового соединения P–O–P близок к 180° . Для бисфосфонатов аналогичное соответствие тоже имеет место, с той лишь разницей, что связь P–C в бисфосфонатах, как правило, длиннее мостиковой связи P–O в пирофосфатах. Например, в бисфосфонате именуемом двуназровая соль тетрагидрофуран-2,2-бисфосфоновой кислоты, структура которого расшифрована в [350], длина связи P–C равна 1.83 \AA , что на 0.2 \AA больше средней длины связи O–P в пирофосфат-анионе. Поэтому обе фосфонатные группы молекулы тоже могут быть помещены в позиции тетраэдров PO_4 апатита, расположенные одна под другой вдоль оси z , с той лишь разницей, что угол связи P–C–P при этом может быть меньше 180° .

Установленные факты – что, согласно данным ЯМР, фосфонатные группы утрачивают способность к вращению при адсорбции, что концентрация ортофосфата в растворе возрастает, а кальция уменьшается при адсорбции, что (по данным ИТС) энтропийный эффект является движущей силой процесса адсорбции – могут быть объяснены в предположении, что обе фосфонатные группы помещаются в соседние позиции тетраэдров PO_4 структуры апатита. Фосфонатные группы ориентируются при этом вдоль оси z и расходятся на расстояние $c/2 = 3.4 \text{ \AA}$. Это оказывается возможным вследствие стереохимического соответствия между структурами бисфосфонатов и апатита, обсуждённого в предыдущем параграфе.

Тот факт, что, согласно калориметрическим данным, движущей силой процесса адсорбции в начальной его стадии (первые минуты) является энтропия, согласуется с предложенным авторами [343] механизмом, когда помещение фосфонатной группы в позицию тетраэдра PO_4 приводит к вытеснению фосфатов в раствор, и высвобождение частиц приводит к возрастанию энтропии системы. Однако такой механизм может служить источником энтропии только если обе фосфонатные группы помещены в позиции тетраэдров, поскольку только в этом случае число высвобождаемых частиц (PO_4) превосходит число сорбируемых молекул, утрачивающих подвижность.

Механизм адсорбции, при котором обе фосфонатные группы помещаются в позиции тетраэдра PO_4 апатита позволяет объяснить все имеющиеся данные, в частности наличие искривлений на кривых калориметрического титрования (ИТС) алендроната, памидроната, заледроната, ризедроната, орто-риздроната и этидроната, Рис. 6-20. Искривления кривых ИТС для указанных шести соединений, свидетельствующие о дополнительной стабилизации адсорбированного слоя в области высоких концентрация адсорбата в

растворе, может быть следствием взаимного притяжения адсорбированных молекул. Для указанных шести соединений группа R_1 на атоме углерода представляет собой гидроксил, а группа R_2 содержит атом N. Притяжение между гидроксилом и азотом соседних молекул может привести к дополнительной стабилизации адсорбированного монослоя. Подобная стабилизация за счёт притяжения соседних молекул обнаружена при адсорбции цитрата апатитом, см ниже раздел 6.3.5

Помещение двух фосфонатных групп в позиции тетраэдров PO_4 апатита знаменует начальную стадию процесса адсорбции (первые минуты). Эта стадия фиксируется данными калориметрического титрования. Судя по кинетическим кривым, свидетельствующим о достижении равновесия за десятки часов, на следующей стадии имеет место некое преобразование гидратированного слоя, сопровождающееся переносом кальция из раствора в кристалл, приводящее к дополнительной стабилизации слоя адсорбированных молекул. Возможно на этой, более медленной, стадии имеет место структурное изменение в гидратированном слое апатита. Можно, например, предположить, что гидратированный слой приобретает структуру апатита. Преобразование гидратированного слоя в апатит должно приводить к выделению в раствор структурированной воды, входящей в состав гидратированного слоя. Тем самым, движущей силой этой стадии процесса, скорее всего, тоже является энтропия, возникающая за счёт высвобождения молекул воды.

6.3.4. Адсорбция макроциклических соединений с фосфонатными группами.

Помимо обсуждённых выше бисфосфонатов, известно также большое количество азотсодержащих макроциклических соединений с фосфонатными группами, образующих стабильные хелатные комплексы с атомами радиоактивных металлов, таких как ^{68}Ga , ^{99}Tc , ^{153}Sm , ^{160}Tb , ^{166}Ho , и в то же время способных связываться с биоапатитом кости за счёт фосфонатных групп. Два примера таких комплексов, DOTP и DPPED, показаны на Рис. 6-22. Лиганд DOTP имеет четыре изолированные фосфонатные группы, а DPPED содержит одну бисфосфонатную группу, присоединённую к макроциклу через фосфиновую группу. Несмотря на повсеместное использование подобных препаратов в радиомедицине для поиска метастазов костей, мне удалось найти лишь одну публикацию, [351], посвящённую их взаимодействию с апатитом.

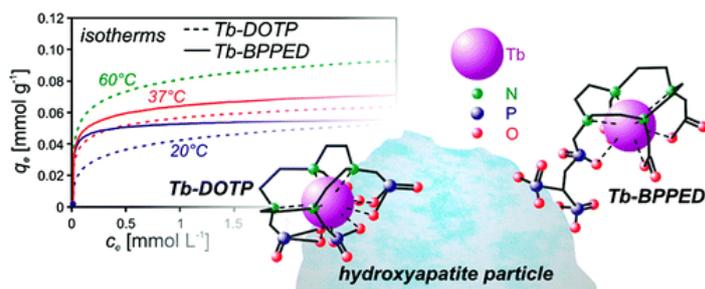


Рис 6-22. Макроциклические лиганды, образующие хелатные комплексы с тербием и связывающиеся с апатитом посредством фосфонатных групп. *Из работы [351].*

Авторы [351] исследовали кинетику и термодинамику адсорбции тербиевых комплексов DOTP и DPPED гидроксилапатитом, используя изотоп ^{160}Tb в качестве маркера. В частности, построив изотермы адсорбции для нескольких температур, они рассчитали термодинамические параметры сорбции по уравнению Ван'т Гоффа. Согласно выводам, представленным в *the abstract*, адсорбция обоих комплексов протекает эндотермически. Тем самым, энтропия является единственной движущей силой адсорбции.

6.3.5. Адсорбция цитрата и фосфоцитрата.

Фосфоцитрат был, вероятно, первым соединением, взаимодействие которого с апатитом было детально исследованным в связи с его необычайной способностью ингибировать нуклеацию, рост и агрегирование кристаллов гидроксилапатита и карбонат-замещенного гидроксилапатита, [352]. На Рис. 6-10 молекула фосфоцитрата показана в состоянии, характерном для диапазона физиологических значений pH. Четыре из пяти ионизируемых групп фосфоцитрата испытывают депротонирование: два –ОН протона из $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ и два протона из групп $-\text{COOH}$.

Из всех известных, это соединение наиболее эффективно препятствует переходу аморфного фосфата кальция в гидроксилапатит. Свободный цитрат тоже является ингибитором кристаллизации и растворения апатита, но примерно в 300 раз менее эффективным (нежели фосфоцитрат), что указывает на важную роль фосфатной группы в связывании молекулы с поверхностью кристалла, [353]. В случае совместного присутствия цитрата и фосфоцитрата наблюдается синергетический эффект: ингибирование кристаллизации усиливается при добавлении небольшого количества цитрата к раствору фосфоцитрата.

Небольшие количества фосфоцитрата обнаруживаются в митохондриях из мягких тканей млекопитающих, [354]. Есть серьёзные основания полагать, что это соединение является (наряду с пирофосфатом) одним из факторов, препятствующих образованию в митохондриях кристаллических фосфатов, [355, 354]. В костях позвоночных фосфоцитрат обнаружен не был. В то же время цитрат присутствует в костях в значительных количествах (около 1% массы, что соответствует 5% органической составляющей кости). Его физиологическая роль была прояснена недавно при исследовании костной ткани птиц, рыб и млекопитающих методами ЯМР (в работе [356], см. ниже).

Изотермы адсорбции. Адсорбция цитрата, фосфоцитрата и их смесей нанокристаллическим гидроксилапатитом исследована в работе [357]. В экспериментах взвесь кристаллов апатита с предварительно измеренной площадью поверхности выдерживалась в растворе цитрата и (или) фосфоцитрата. Четырёхчасовой выдержки было достаточно для достижения равновесия. Полученные данные, представленные на Рис. 6-23, согласуются с представлением о более высоком средстве фосфоцитрата с поверхностью гидроксилапатита. Например, при концентрации цитрата в растворе равной $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/liter}$ равновесное количество адсорбированного вещества составляет $1.3 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$, а при той же равновесной концентрации фосфоцитрата адсорбируется более чем в два раза большее количество, $2.8 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$. Однако различие между цитратом и фосфоцитратом оказалось не столь разительным (способность фосфоцитрата ингибировать нуклеацию кристаллов гидроксилапатита, напомним, в 300 раз выше чем у цитрата).

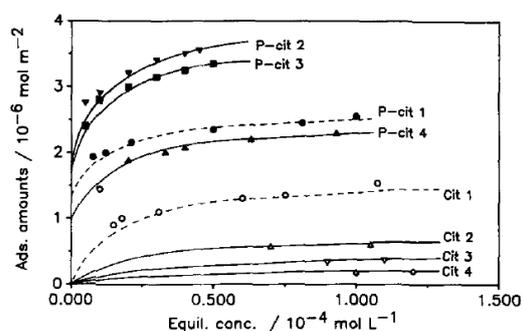


Fig. 2. Adsorption onto HAP of citrate, phosphocitrate, and the combined additives. *Upper part.* Phosphocitrate adsorption: P-cit 1 (zero citrate, ●), P-cit 2 ($0.6-0.8 \times 10^{-4}$ mol liter $^{-1}$ citrate, ▼), P-cit 3 (1.1×10^{-4} mol liter $^{-1}$, ■), P-cit 4 ($1.3-1.4 \times 10^{-4}$ mol liter $^{-1}$ citrate, ▲). *Lower part.* Citrate adsorption: Cit 1 (zero phosphocitrate, ○), Cit 2 (1.3×10^{-4} mol liter $^{-1}$ phosphocitrate, △), Cit 3 (1.5×10^{-4} mol liter $^{-1}$ phosphocitrate, ▽), Cit 4 (1.6×10^{-4} mol liter $^{-1}$ phosphocitrate, ◇).

Рис 6-23. Изотермы адсорбции цитрата, фосфоцитрата и их смесей кристаллами гидроксилатапата.
Из работы [357].

В работе [357] был в целом подтверждён синергизм, наблюдавшийся ранее при ингибировании кристаллизации смесью цитрата и фосфоцитрата, хотя детали этого явления оказались несколько неожиданными. При добавлении фосфоцитрата к раствору цитрата происходит вытеснение цитрата с поверхности апатита, и при наличии 1.6×10^{-4} mol/liter фосфоцитрата в растворе количество адсорбированного апатитом цитрата снижается практически до нуля, “Cit 4” на Рис. 76. Добавление же небольшого ($0.6-1.1 \times 10^{-4}$ mol/liter) количества цитрата сопровождается увеличением количества адсорбированного фосфоцитрата. Влияние сорбции на состав раствора, к сожалению, исследовано не было.

Вариации содержаний ионов кальция, фосфата и водорода в растворе при адсорбции цитрата гидроксилатапатитом были исследованы в [358]. Мне доступен лишь *the abstract* публикации, согласно которому, в разбавленных растворах лимонной кислоты (от 4 до 12.5 mmol/L), имеет место обмен ионами с поверхностью, а в области более высоких концентраций происходит растворение поверхности с образованием игольчатых кристаллов цитрата кальция. Авторы утверждают, что наиболее активно в ионообмене участвуют поверхности граней $(10\bar{1}0)$ апатита. Область насыщения соответствует адсорбированию примерно одной молекулы цитрата на каждую элементарную ячейку апатита, выходящую на грань $(10\bar{1}0)$. Подробности, которые позволили бы хоть отчасти прояснить степень обоснованности выводов, в *the abstract* не приведены.

Механизм адсорбции. Вопрос о вероятном механизме связывания фосфоцитрата с поверхностью гидроксилатапатита обсуждается не первый десяток лет. Высказывалось предположение, что фосфоцитрат связывается с ионами кальция на поверхности кристалла за счёт образования хелатных комплексов. Однако титрование Ca^{2+} и H^+ показало, что это соединение не является сильным хелатообразователем, [353]. Интересные сведения обнаруживаются в теоретическом исследовании [359].

Авторы [359] пытаются прояснить вопрос о механизме хемосорбции цитрофосфата теоретически, используя методы расчёта энергии молекул и кристаллов, основанные на теории псевдопотенциала. Результаты выполненных расчётов представляют интерес с кристаллохимической точки зрения.

В своих расчётах авторы [359] «помещали» молекулу фосфоцитрата вблизи поверхности грани призмы $(10\bar{1}0)$ гидроксилатапатита. Координаты всех атомов в решётке кристалла кроме ионов гидроксила были фиксированы. Координаты всех атомов в

молекуле фосфоцитрата, а также координаты гидроксил-ионов в кристалле менялись таким образом, чтобы система пришла в состояние с минимальной энергией. Поиск минимума осуществлялся с использованием метода сопряжённых градиентов.

Полученная в [359] конфигурация, соответствующая минимальной энергии комплекса, состоящего из молекулы фосфоцитрата и грани $(10\bar{1}0)$ гидроксилapatита, показана на Рис. 6-24. Согласно расчётам, молекула самопроизвольно принимает положение, позволяющее всем её отрицательно заряженным группам взаимодействовать с атомами кальция на поверхности кристалла. При этом кислороды карбоксильной и фосфатной групп частично достраивают координационный полиэдр кальция (неполный, вследствие рассечения кристалла гранью). Фосфатная группа молекулы располагается в позиции, которую занимал бы анион PO_4^{3-} , если бы сплошность кристалла не была нарушена гранью.

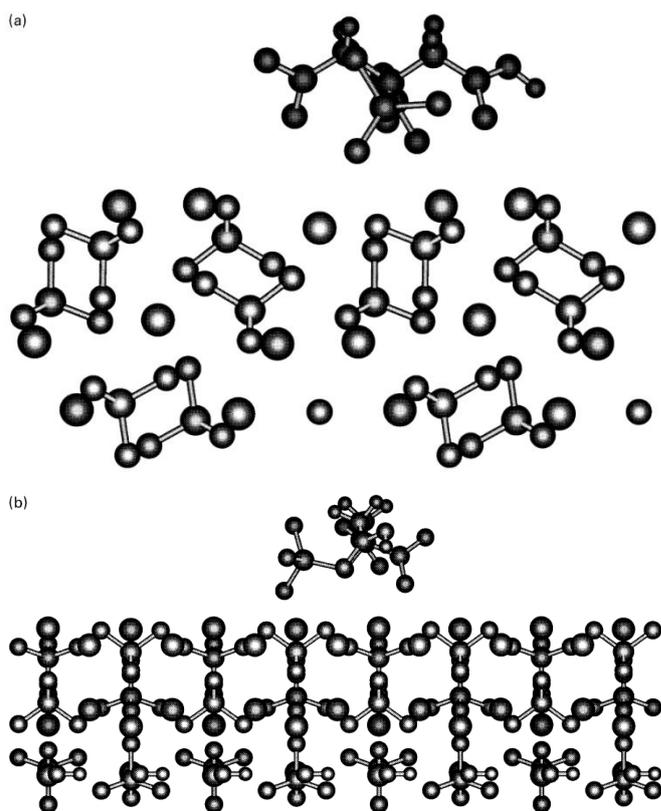


Fig. 5. (a) The optimized geometry of interaction between the PC and the neutral slab of $(10\bar{1}0)$ surface of hydroxyapatite. Only a small fragment of the surface used for the modeling is shown. Upon binding the PC molecule orients itself on the surface in the position that allows all of its negatively charged groups to interact with the calcium ions of the surface. This orientation allows the carboxylate groups and negatively charged phosphate group to partially complete calcium coordination polyhedra, disrupted due to crystal discontinuity at the surface. The phosphate group of PC positions itself in a site at the surface that would be occupied by phosphate ion if the lattice were continued upward. Large spheres in the crystal lattice represent calcium ions, small spheres represent oxygen atoms in OH^- ; (b) Side view of a.

Рис 6-24. Расположение молекулы цитрофосфата на электронейтральной поверхности грани $(10\bar{1}0)$ кристалла гидроксилapatита соответствующее минимальному значению энергии, согласно расчётам авторов [359].
Из работы [359].

Авторы обсуждаемой статьи повторили свои расчёты для грани соответствующей другой глубине «среза» кристалла, несущей отрицательный заряд, и получили сходные результаты. Фосфатная группа фосфоцитрата также оказалась локализованной в кристаллографической позиции тетраэдра PO_4 .

Оставляя в стороне вопрос о степени правдоподобия результатов обсуждаемых здесь расчётов, не учитывающих влияния ни гидратированного слоя (грань $(10\bar{1}0)$ апатита покрыта гидратированным слоем, см. раздел 6.2), ни раствора, полученная в них схема адсорбции, в которой атомы кислорода кислотных групп сорбируемой молекулы

дистраивают разрушенные координационные полиэдры атомов кальция на поверхности кристалла, представляется весьма разумной. Авторы многих современных работ полагают, что кислотные группы (фосфатные, фосфонатные, карбоксильные) адсорбируемых молекул встраиваются в позиции фосфатов в поверхностном слое апатита, вытесняя последние в раствор. Схема адсорбции, возникшая спонтанно в расчетах авторов [359] предлагает интересную альтернативу, в которой монослой сорбируемых молекул надстраивается *над* поверхностью кристалла без вытеснения фосфат-ионов в раствор, и, тем не менее, фосфатные группы молекул располагаются в позициях тетраэдров PO_4 кристалла.

Несмотря на неослабевающий интерес медиков и физиологов к возможным функциям фосфоцитрата, до настоящего времени не было выполнено ни одного спектроскопического исследования механизма связывания его с апатитом. Адсорбция цитрата, напротив, была исследована методами оптической спектроскопии (в УФ диапазоне) [360], многоядерной ЯМР-спектроскопии, [356], и атомно-силовой микроскопии, [361].

Авторы [360] изучали адсорбцию цитрата синтетическим гидроксилapatитом из разбавленных растворов лимонной кислоты при разной температуре, с использованием оптической спектроскопии. Согласно выводам, помещённым в *the abstract*, карбоксильные группы цитрата связываются с кристаллом, замещая фосфат-ионы на его поверхности. Одна молекулы цитрата встраивает свои карбоксильные группы в две соседние позиции тетраэдров PO_4 апатита. Авторы также исследовали термодинамику и кинетику процесса адсорбции и пришли к выводу, что термодинамические и кинетические параметры также согласуются с предложенным механизмом адсорбции. В отсутствие конкретных данных у нас нет возможности оценить, насколько эти выводы обоснованы. Тем не менее нужно отметить, что с кристаллохимической точки зрения осуществимость предложенного механизма адсорбции, посредством встраивания молекулы цитрата в две соседние позиции тетраэдров PO_4 , сомнения не вызывает. В самом деле, цитрат-замещённый кристаллический гидроксилapatит (в котором часть фосфата замещается на цитрат) был получен экспериментально в работе [362].

Сходные выводы о механизме связывания цитрата с апатитом были сделаны в сравнительно недавнем исследовании цитрата в костной ткани птиц, рыб и млекопитающих [356] с использованием многоядерной ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C и ^{31}P , прояснившее физиологическую роль цитрата кости.

Как известно, кость представляет собой композиционный материал из нанокристаллов апатита (гидроксилapatита с примесью карбонатапатита), погружённых в органическую матрицу, состоящую главным образом из коллагена (фибрилярного белка), [363,289]. Кристаллы апатита, обычно в виде табличек вытянутых вдоль оси z , имеют толщину порядка 3 nm, что соответствует четырём элементарным ячейкам его структуры. Считается, что столь малая толщина кристаллов обеспечивает оптимальные механические свойства композита, в частности препятствует разрастанию трещин, однако механизм, поддерживающий длительное существование столь тонких кристаллов в кости, до появления работы [356] оставался неизвестным. В нормальных условиях апатитовые нанокристаллы достаточно быстро укрупняются, уменьшая свою поверхностную энергию, [310].

Расшифровка спектров ЯМР высокого разрешения и вычисление межатомных расстояний, выполненные авторами [356], показали, что поверхность апатитовых нанокристаллов в кости – по их собственному выражению – утыкана (*studded*) химически с ней связанными молекулами цитрата. Молекулы распределены по поверхности неравномерно, так что примерно одна шестая часть доступной поверхности покрыта молекулами, и плотность покрытия этой части оценивается в одну молекулу на каждые два nm^2 . Ось удлинения молекулы примерно параллельна поверхности кристалла, и атомы углерода групп COO^{2-} отстоят на 0.3-0.45 nm от ближайших к ним атомов фосфора на

поверхности кристалла. Расстояние между центрами соседних групп COO^{2-} цитрата оказалось равным 0.32 nm, что очень близко к половине параметра с решётки, $c/2=0.34$ nm. Выводы авторов [356] о структуре траней нанокристаллов апатита кости проиллюстрированы на примере грани $(10\bar{1}0)$ апатита, Рис. 6-25. Адсорбированные молекулы (и их карбоксильные группы) расположены над кристаллом. Ориентация молекул цитрата и их концентрация на единицу площади соответствуют экспериментально найденным значениям. (Призматическая грань $(10\bar{1}0)$ часто используется при моделировании биоапатита кости; в действительности же известно только, что уплощённые таблитчатые нанокристаллы биоапатита кости вытянуты вдоль оси z , т.е. некая грань гексагональной призмы имеет наибольшую поверхность, но сама грань пока отождествлена не была.)

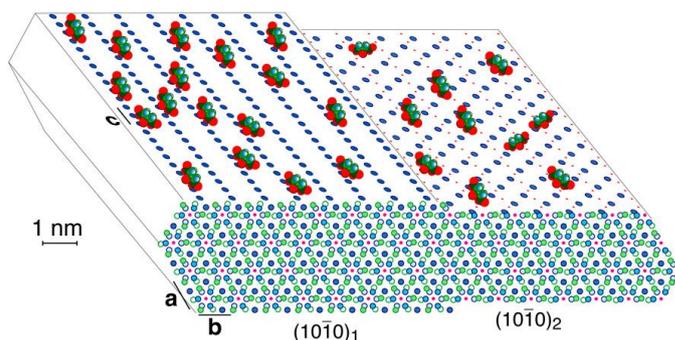


Рис 6-25. Схема сорбции молекул цитрата для двух моделей грани $(10\bar{1}0)$ кристалла апатита.

/Schematic of apatite-bound citrate (with oxygen of the carboxylates in red) interacting with Ca^{2+} on two surfaces of high morphological importance of an idealized bone apatite nanocrystal, at a realistic citrate surface density of $\text{Ca} \cdot 1/2 \text{ nm}^2$. Calcium ions are blue filled circles on top and front surfaces, P is green (omitted on the top surfaces), OH^- ions are pink dots, while phosphate oxygen is omitted for clarity. The hexagonal crystal structure projected along the c -axis (with greater depth of atoms indicated by lighter shading) shown in front reveals various layers of phosphate and calcium ions.
Из работы [356]

Сразу отметим, в своих рассуждениях авторы [356] упускают из виду, что два тетраэдра PO_4 в структуре апатита тоже разнесены на расстояние $c/2$. При ближайшем рассмотрении, все полученные ими данные согласуются с предположением о размещении карбоксильных групп сорбируемых молекул в позициях тетраэдров PO_4 , сделанном ранее в [360]. В частности, авторы [356] интерпретируют измеренное ими расстояние от углерода группы COO^{2-} до ближайших к ней атомов фосфора, равное 0.3-0.45 nm, как расстояние, на которое молекула цитрата удалена от поверхности кристалла. Отметим, если карбоксильную группы поместить в позицию тетраэдра PO_4 (не над гранью кристалла, а непосредственно в самую грань), то атом углерода будет удалён от соседних атомов фосфора в структуре апатита именно на такие расстояния.

Имеется ещё одно исследование адсорбции цитрата гидроксилapatитом, работа [361], представляющая значительный интерес. Остаётся лишь сожалеть, что через интернет мне доступны только *the abstract* и одна иллюстрация. Методом атомно-силовой микроскопии авторы [361] исследовали грань $(10\bar{1}0)$ кристалла гидроксилapatита с адсорбированными молекулами цитрата, Рис. 6-26. В своих выводах авторы пишут, что лишь концевые карбоксильные группы молекул участвуют в связывании с апатитом, и это согласуется с выводами обсужденных выше работ [356, 360]. Кроме того авторы обнаружили, что не связанная с поверхностью кристалла средняя карбоксильная группа цитрата может взаимодействовать с гидроксильной группой соседнего цитрата, вследствие чего имеет место самоорганизация молекул на поверхности. Тем самым, адсорбированные молекулы цитрата испытывают взаимное притяжение с развитием двумерного дальнего порядка на сорбирующей грани.

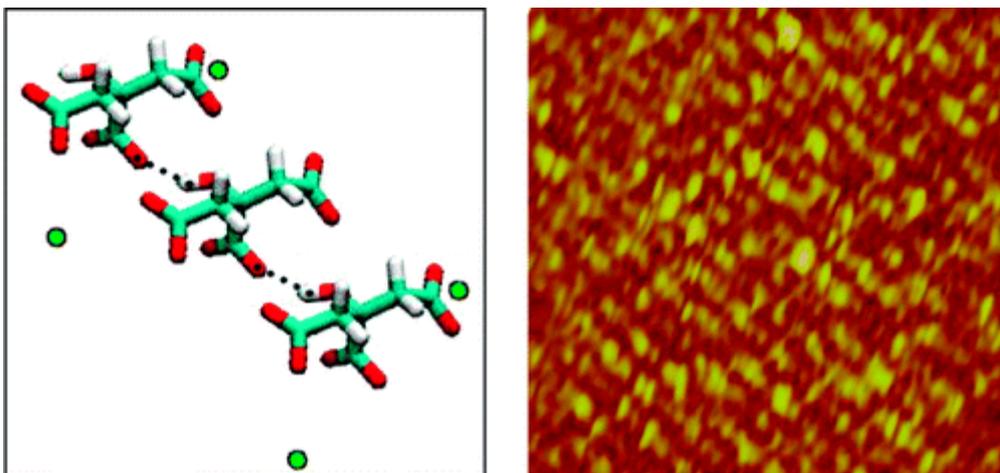


Рис 6-26. Изображение грани $(10\bar{1}0)$ кристалла гидроксилапатита с адсорбированными молекулами цитрата, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии. Из работы [361].

6.3.6. Адсорбция полиалкеновых кислот апатитом.

Полиалкеновые кислоты входят в состав т.н. полиалкеноатных или стеклоиономерных цементов, используемых для реставрации зубов. Поэтому взаимодействие ряда представителей этого класса поликарбоновых кислот с гидроксилапатитом и биоапатитом исследовано детально и тщательно. Наиболее подробные сведения имеются для полиакриловой кислоты (Рис. 6-27), и сополимеров полиакриловой и полималеиновой, (Рис. 6-28), кислот. В данном разделе полиакриловая кислота и сополимеры полиакриловой и полималеиновой кислот обозначаются, соответственно, как РАА и s-РА.

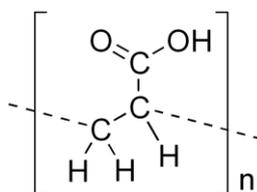


Рис 6-27. Полиакриловая кислота.

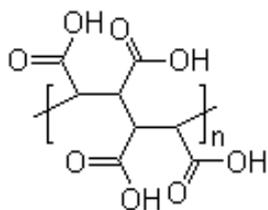


Рис 6-28. Полималеиновая кислота

Физико-химические данные. Адсорбция полиакрилат-анионов поверхностью синтетического гидроксилапатита из растворов полиакрилата натрия и РАА исследовалась в [364]. Авторы также изучили сопутствующие изменения в составе раствора. Адсорбция полиакрилата сопровождается увеличением концентрации фосфата в растворе и уменьшением концентрации кальция. При этом по мере увеличения количества адсорбированного вещества, концентрация фосфата возрастает монотонно, а количество кальция проходит через минимум.

Детальное физико-химическое исследование адсорбции РАА суспензией гидроксилапатита было выполнено в работе [365]. Авторами изучена поверхностная

концентрации PAA адсорбированного кристаллическим гидроксилпатитом как функция концентрации PAA в водном растворе, температуры, pH, и ионной силы раствора.

На Рис. 6-29 показаны построенные в [365] кинетические кривые адсорбции PAA гидроксилпатитом, свидетельствующие, как считают авторы, о достижении равновесия менее чем за 40 минут.

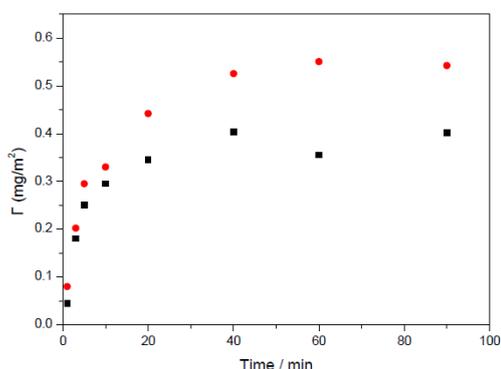


Figure 3. Variation of the surface concentration, Γ , of PAA with incubation time at 30°C for the adsorption of PAA on HAP crystals at 0.1 mol·dm⁻³ (•) and 0.5 mol·dm⁻³ (•). Initial concentration of PAA = 300 mg L⁻¹ and pH = 7.0

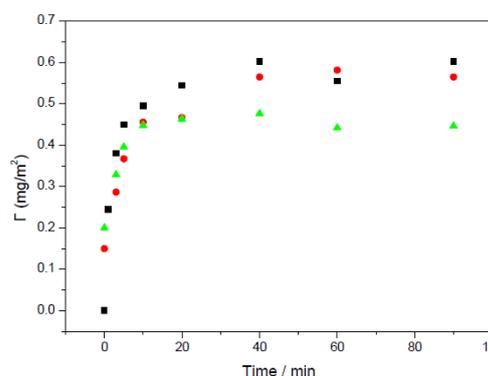


Figure 4. Variation of the surface concentration, Γ , of PAA with incubation time at 30°C (•), 50°C (•) and 70°C (▲) for the adsorption of PAA on HAP crystals. Initial concentration of PAA = 300 mg L⁻¹, $I = 0.5 \text{ mol dm}^{-3}$ and pH = 7.0

Рис 6-29. Поверхностная концентрация полиакриловой кислоты (PAA) адсорбированной поверхностью гидроксилпатита как функция времени выдержки при 30°, 50° и 70° С. Во всех экспериментах исходная концентрация PAA в растворе составляла 300 мг/л. *Из работы [365].*

Изотермы адсорбции PAA гидроксилпатитом при 30°, 50° и 70° С, построенные в работе [365], показаны на Рис 6-30. Согласно этим данным, повышение температуры не сказывается на поверхностной концентрации PAA в области низких концентраций. Однако при более высоких концентрациях, порядка 400 мг/л и выше, повышение температуры сопровождается снижением количества адсорбированной PAA. Указанный эффект, отметим, может быть кинетической природы.

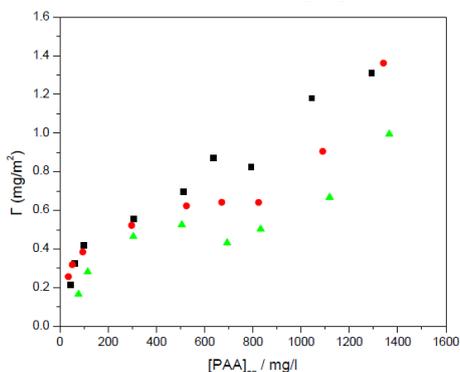


Figure 7. Variation of the surface concentration, Γ , of PAA as a function of the equilibrium PAA concentration in the solution, $[PAA]_{eq}$, for the adsorption of PAA on HAP crystals at 30°C (•), 50°C (•) and 70°C (▲). $I = 0.5 \text{ mol dm}^{-3}$ and pH = 7.0.

Рис 6-30. Поверхностная концентрация полиакриловой кислоты (PAA) адсорбированной кристаллами гидроксилпатита как функция концентрации её в водном растворе при 30°, 50° и 70° С. Во всех опытах pH 7.0; ионная сила ($I = 0.5 \text{ mol/L}$) поддерживалась раствором NaCl. *Из работы [365].*

Значительный интерес представляют данные [365] о влиянии pH на адсорбцию PAA гидроксилпатитом, Рис. 6-31. Увеличение pH в диапазоне от pH 4 до pH 6 приводит в возрастанию количества адсорбированной PAA. Дальнейшее увеличение pH, в области pH 6.5 - 9 не оказывает существенного влияния на сорбцию. Обнаруженную закономерность авторы объясняют изменением степени диссоциации PAA. Согласно их расчётам, при pH 4.5 степень диссоциации PAA составляет 0.15, а при $6.5 < \text{pH} < 9$ PAA

почти полностью диссоциирована: степень её диссоциации лежит в диапазоне 0.94 - 0.99. Тем самым, для успешной адсорбции кислотные группы молекулы должны быть диссоциированными (депротонированными).

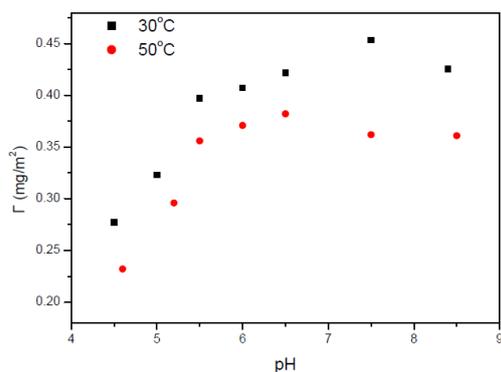


Рис 6-31. Влияние pH на адсорбцию полиакриловой кислоты (PAA) гидроксилапатитом при 30° и 50° С. Во всех опытах исходная концентрация PAA в растворе составляла 280 mg/L. Ионная сила $I = 0.1 \text{ mol/L}$ поддерживалась раствором NaCl. Из работы [365].

Для выяснения влияния ионной силы раствора на адсорбцию PAA гидроксилапатитом авторы [365] построили изотермы адсорбции для двух концентраций NaCl в растворе, соответственно 0.1 mol/L и 0.5 mol/L, Рис. 6-32. Как можно видеть, при 30° С (левый график на этом рисунке) пятикратное увеличение концентрации NaCl сопровождается значительным, примерно на 40%, увеличением количества адсорбированного PAA. При 50° С, аналогичное увеличение концентрации NaCl тоже приводит к увеличению количества адсорбированной PAA, но в меньшей степени (правый график на Рис. 6-32).

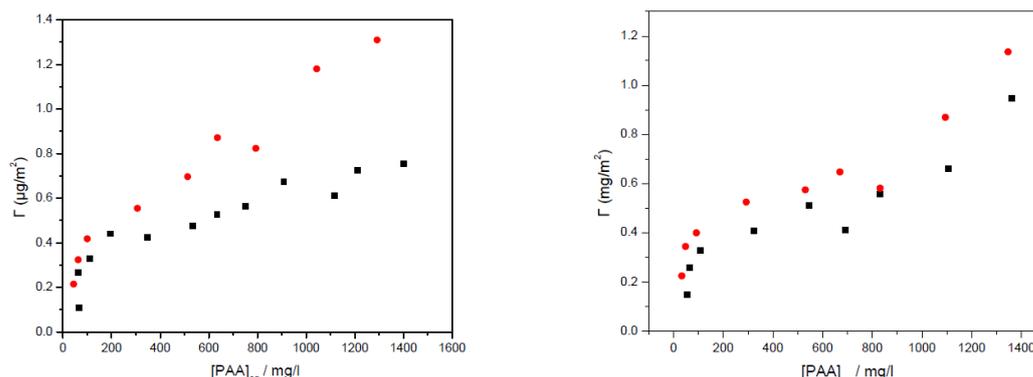


Рис 6-32. Влияние концентрации NaCl на адсорбцию полиакриловой кислоты (PAA) гидроксилапатитом. На графиках представлены изотермы адсорбции PAA при концентрации NaCl равной 0.1 mol/L (чёрные квадраты) и 0.5 mol/L (красные кружки). Слева показаны изотермы для 30° С, а справа – для 50° С.

Из работы [365].

Построив термодинамическую модель адсорбции, авторы оценили значения свободной энергии, энтальпии и энтропии адсорбции адсорбированных молекул, Таблица 6-3. Согласно их оценкам, реакция адсорбции является эндотермической во всём исследованном диапазоне температур и составов. Энтропийный эффект, тем самым, является единственной движущей силой адсорбции.

Таблица 6-3. Оценки термодинамических параметров молекул полиакриловой кислоты адсорбированных поверхностью гидроксилapatита при различных значениях температуры и ионной силы раствора.

Из работы [365].

	30°C		50°C		70°C	
	0.1M	0.5M	0.1M	0.5M	0.1M	0.5M
ΔG°_{ads} (KJ mole ⁻¹)	-3.06	-2.51	-5.18	-4.52	-6.48	-5.94
ΔH°_{ads} (KJ mole ⁻¹)	2.11	3.83	2.11	3.83	2.11	3.83
$-T\Delta S^{\circ}_{ads}$ (KJ mole ⁻¹)	-5.17	-6.34	-7.29	-8.35	-8.59	-9.77

Влияние размеров молекулы полиалкеновых кислот на сорбируемость их гидроксилapatитом исследована в работах [366,367]. Установлено, что полианионы бóльшей молекулярной массы всегда обнаруживают более высокое сродство к поверхности минерала. Кроме того, в работе [368] исследовано влияние размера молекулы на прочность соединения полиалкеновой кислоты с дентином. Были изучены соединения дентина с образцами полиакриловой кислоты и сополимера, состоящего на 90% из мономеров акриловой кислоты, а на 10% – из мономеров малеиновой кислоты. Полимеры имели молекулярную массу 5000, 8000, 15000, 25000 FBLC. Показано, что прочность связи молекулы с дентином возрастает при увеличении молекулярной массы.

Данные спектроскопии; механизм связывания. Как было выше упомянуто, полиалкеновые кислоты входят в состав т.н. полиалкенадных или стеклоиономерных цементов, используемых в стоматологии. В отличие от других составов, стеклоиономерные цементы соединяются с дентином и зубной эмалью не только посредством т.н. микромеханического сцепления (*micromechanical interlocking*), но и за счёт химической адгезии карбоксильных групп полианионов к поверхности биоapatита эмали и дентина. Принцип действия стеклоиономерных цементов и протекающие в них химические реакции описаны, например, в [369-372]. Нас здесь будет интересовать лишь природа химической адгезии цемента, обусловленная особенностями взаимодействия полиалкеновых кислот с гидроксилapatитом, механизм которого был тщательно изучен на примере РАА и s-РА.

Взаимодействие водных растворов полиалкеновых кислот с гидроксилapatитом протекает в две стадии. После приведения минерала в контакт с раствором, на первой стадии, длящейся 10-20 секунд, происходит частичное растворение тонкого слоя на поверхности апатита с выделением кальция и фосфата в раствор. При этом рН среды, вследствие нейтрализации кислоты, повышается: если до начала реакции рН лежит в пределах 0.97 – 2.83 (в зависимости от разновидности цемента), то после её завершения рН повышается до 6.30 – 7.11, [373]. Эта стадия, по существу, представляет собой то, что в биохимии и медицине называют декальцинированием. На следующей стадии полимер химически соединяется с поверхностью минерала. Природа возникающих при этом химических связей была выяснена в работах [374,375].

Авторы [374,375] изучали взаимодействие синтетического гидроксилapatита, а также биоapatита из дентина и эмали (зубов человека) с водными растворами полиакриловой кислоты (РАА) и сополимера, 90% мономеров в котором состояли из акриловой кислоты, а 10% из малеиновой кислоты (s-РА). Авторы сумели осторожно удалить не прореагировавший полимер с поверхности апатита, обнажив нижний слой, более прочно связанный с минералом. Этот прореагировавший слой исследовался методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (XPS). Было также измерено содержание Са и Р в растворе.

Исследование спектров XPS показало, что карбоксильные группы РАА и s-РА образовали ионные связи с атомами кальция апатита. На Рис. 6-33 сопоставлены участки

спектра XPS в области C 1s для исходной s-PA и для s-PA прореагировавшей с поверхностью гидроксилатапата. (Аналогичные спектры, полученные авторами для PAA, здесь не приводятся, ввиду их сходства с таковыми для s-PA.) Сопоставление спектров показывает, что максимумы интенсивности соответствующие связям C–C и C–H в прореагировавшем слое и в исходной полиалкеновой кислоте практически совпадают. В то же время пик соответствующий карбоксильным группам s-PA в прореагировавшем слое уширен и смещён в область более низких энергий.

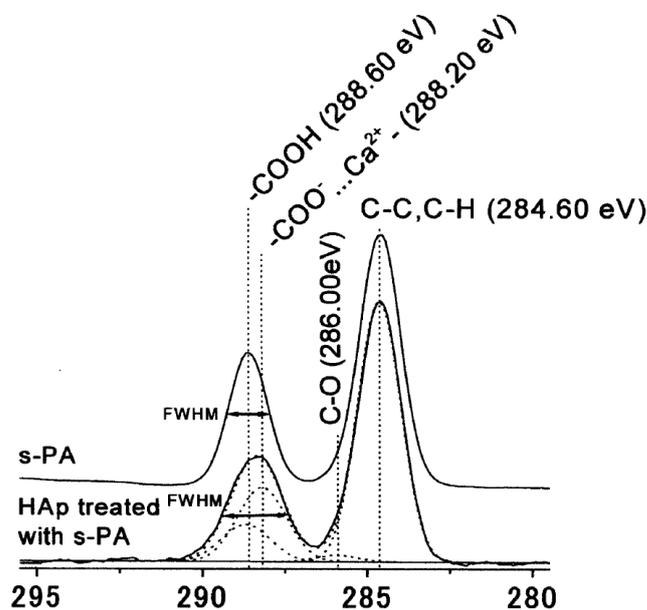


Рис 6-33. Рентгеноэлектронные спектры области C 1s сополимера акриловой и малеиновой кислот (s-PA) и поверхности гидроксилатапата модифицированного s-PA (HAp treated with s-PA). Пик карбоксильной группы гидроксилатапата обработанного s-PA уширен и смещён в область более низких энергий. Разложение смещённого пика на две составляющие даёт комбинацию двух пиков: одного с энергией 288.6 eV, соответствующей непрореагировавшим группам –COOH, и другого, с более низкой энергией 288.2 eV, соответствующего карбоксильным группам, образовавшим ионные связи –COO···Ca²⁺ с кальцием гидроксилатапата. Площадь пика –COO···Ca²⁺ (288.2 eV) примерно вдвое больше площади пика –COOH (288.6 eV), и это говорит о том, что примерно две трети карбоксильных групп прореагировали с кальцием гидроксилатапата. *Из работы [375]*

Авторы [374,375] полагают, что соответствующий карбоксильной группе пик смещается в область более низких энергий потому, что энергия связи углерода карбоксильной группы с кислородом уменьшается в результате образования ионной связи этого кислорода с кальцием. Уширение пика интерпретируется как следствие сосуществования двух популяций карбоксильных групп: тех, что образовали связи –COO···Ca²⁺, и не прореагировавших групп –COOH. Анализ спектров XPS показал (см. пояснения к Рис. 6-33), что, в случае s-PA, 67.5±6.1% карбоксильных групп образовали связи с кальцием. Для PAA аналогичное исследование показало, что 49.5±4.8% карбоксильных групп образовали ионные связи с кальцием.

Исследование состава растворов показало присутствие Ca и P, причём отношение Ca/P (составившее 2.03 w/w и 1.63 w/w для PAA и s-PA, соответственно) в обоих случаях оказалось ниже чем в гидроксилатапате (2.16 w/w). Тем самым фосфат переходит в раствор активнее кальция при взаимодействии минерала с полиалкеновой кислотой. В то же время XPS-анализ поверхности гидроксилатапата, обработанной s-PA, показал отношение Ca/P 1.59 (±0.04), намного выше чем в необработанном гидроксилатапате, 1.30 (±0.02). На основании этих данных авторы[374,375] приходят к выводу, что карбоксильные группы полианиона образуют ионные связи с атомами кальция субстрата, вытесняя фосфат-ионы в раствор.

Помимо гидроксилapatита, авторы [374,375] исследовали также взаимодействие PAA и s-PA с биоapatитом эмали и дентина. Результаты оказались близки к тому, что было получено для гидроксилapatита. Минеральная составляющая зубной эмали и дентина, как известно, существенно отличается от гидроксилapatита по составу. Большинство современных авторов (см. например [289]) описывают минерал зубной ткани как плохо-окристаллизованный, Ca-дефицитный карбонатизированный гидроксилapatит (в котором часть анионов PO_4^{3-} замещена на CO_3^{2-}). В апатите эмали, кроме того, часть гидроксил-ионов замещена на фтор. Таким образом, сходство результатов для гидроксилapatита, дентина и эмали показывает, что небольшие вариации состава анионов и стехиометрии кристаллов не оказывают существенного влияния на механизм их взаимодействия карбоксильными группами полианиона.

Заканчивая обсуждения работ [374,375], остановимся на вероятной причине более эффективного взаимодействия s-PA с поверхностью гидроксилapatита, по сравнению с PAA. Напомним, 67.5 % карбоксильных групп s-PA образовали ионные связи с кальцием гидроксилapatита, а при модифицировании поверхности гидроксилapatита PAA лишь 49.58% карбоксильных групп образуют такие связи. Авторы F,G объясняют это различие стерическими причинами, не поясняя, в чём конкретно они могли бы заключаться. Не ставя под сомнения возможную роль стерических различий между мономерами акриловой и малеиновой кислот в сорбции, отметим, что при сопоставлении s-PA и PAA использованных в экспериментах обнаруживается ещё одно различие: олигомеры PAA состояли, в среднем, из 13-ти мономеров, а олигомеры s-PA – из 20-ти. В работах [366,367] было показано, что олигомеры большей массы всегда проявляют более высокое сродство к апатиту. Тем самым, более эффективное взаимодействие олигомеров s-PA с гидроксилapatитом, вероятно, является следствием большего размера молекулы.

Кристаллы апатита с примесью PAA. В работе [376] при изучении возможностей приготовления новых композиционных материалов на основе гидроксилapatита и PAA, прямым синтезом из водных растворов были получены кристаллы апатита содержащие до 9 wt % PAA. (В более ранней работе [377] те же авторы сообщают о получении кристаллов гидроксилapatита содержащих до 15% wt PAA.) Рентгенодифракционный анализ показал, что кристаллы имели структуру апатита во всём диапазоне составов, хотя вхождение полимера и приводит к уширению дифракционных максимумов, свидетельствующему об уменьшении степени кристалличности. Детальный анализ уширения пиков показал, что нарушение кристалличности происходит преимущественно в направлении перпендикулярном оси z . При увеличении содержания PAA морфология кристаллов изменяется закономерным образом, так что отношение длины кристалла к его ширине монотонно возрастает, т.е. рост кристаллов преимущественно осуществляется вдоль оси z . Из этого авторы [376] заключают, что молекулы полианиона преимущественно ориентированы параллельно оси z кристаллов.

6.3.7. Адсорбция аминокислот и кислотных пептидов апатитом.

В настоящем разделе собраны сведения лишь о нескольких представителях обширного класса кислотных пептидов и белков, так или иначе взаимодействующих с апатитом. Критерием отбора именно этих соединений было наличие экспериментальных данных (физико-химических, калориметрических, спектроскопических, рентгеноструктурных), позволяющих судить о механизме связывания лигандов с поверхностью минерала или идентифицировать сорбирующую грань кристалла.

6.3.7.1. Аминокислоты.

Единственное известное мне систематическое сравнительное исследование сродства аминокислот к апатиту [378] было выполнено 1969 г. при участии Уильяма и Маргарет Нейман. Авторы исследовали адсорбцию 22-х аминокислот тонкокристаллическим

гидроксилапатитом. Было обнаружено, что все протеиногенные аминокислоты кроме оксипролина в той или иной степени проявляют способность адсорбироваться апатитом. Кислотные аминокислоты в целом адсорбируются активнее основных, в согласии с представлениями (авторов), согласно которым аминокислоты взаимодействуют с поверхностью апатита, помещая свои карбоксильные группы в позиции тетраэдров PO_4 его кристаллической структуры. Ещё одно подтверждение этих представлений авторы видят в том, что склонность к адсорбции резко уменьшается при переходе от аспартата к аспарагину (с заменой карбоксильной группы на амидную).

Ещё одна закономерность, подмеченная авторами, состоит в том, что для аминокислот с единственной карбоксильной группой сродство к апатиту уменьшается по мере укрупнения молекулы. Иллюстрацией этого правила служит усиление сродства к апатиту в ряду лейцин < валин < аланин < глицин.

Для аминокислот с двумя карбоксильными группами, сродство к апатиту возрастает в ряду цистин < глутамат < аспарат. Изготовив модели молекул, авторы обнаружили, что карбоксильные группы аспартата и глутамата (*Asp* и *Glu* на Рис. 6-35) легко могут быть помещены в две соседние позиции тетраэдров PO_4 структуры апатита (вдоль оси z), а аналогичные группы цистина (Рис. 6-34) помещаются в две позиции PO_4 , не являющиеся соседними. Таким образом, меньшее сродство цистина к апатиту может быть следствием двух причин: большим размером сорбируемой молекулы и неовозможностью поместить сразу две её карбоксильные группы в позиции ортофосфата без существенной деформации молекулы.

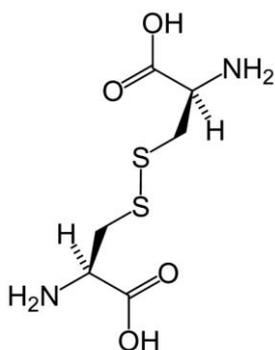


Рис 6-34. Цистин.

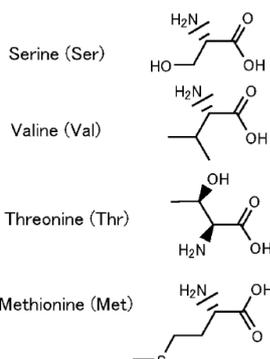
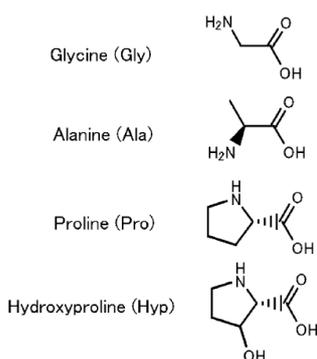
Исследовав адсорбцию трёх первых олигомеров глицина, авторы обнаружили, что сродство к апатиту возрастает в последовательности диглицин < триглицин < глицин. Сопоставление моделей молекул и структуры апатита показало, что диглицин может заместить лишь один тетраэдр PO_4 на поверхности грани, а триглицин, подобно цистину, способен заместить два тетраэдра, не являющихся соседними.

Авторы также обнаружили, что добавление пирофосфата в раствор практически блокирует адсорбцию аминокислот. Отсюда сделан вывод о конкуренции молекул за одни и те же центры адсорбции.

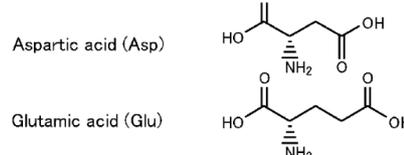
Сравнительное исследование адсорбции серина и фосфосерина апатитом было выполнено в [379]. Фосфосерин, как и следовало ожидать, связывается с апатитом активнее серина.

Кристаллы апатита с примесью аминокислот. Процесс образования смешанных фаз этого типа детально исследован в работе [380]. Авторы осаждали гидроксилапатит из водного раствора содержащего 0.5 mol/l аминокислоты. Были исследованы все 12 аминокислот, хорошо растворимых в воде, см. Рис. 6-35. Вхождение аминокислоты в состав кристаллов, проявляющееся в значимых уменьшениях концентрации Ca и PO_4 в апатите, отмечено только для двух аминокислот – аспарагиновой и глутаминовой.

Neutral amino acids



Acidic amino acids



Basic amino acids

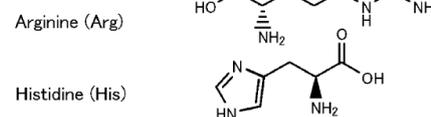


Рис 6-35. Структурные формулы растворимых в воде аминокислот, способность которых входить в состав гидроксилapatита была исследована в [380].

Вхождение аминокислоты в состав кристаллов сопровождается уменьшением их размеров и уплощением. Рентгеновские дифрактограммы образцов согласуются с дифрактограммой гидроксилapatита, однако наблюдается значительное уширение пиков (по сравнению с гидроксилapatитом, полученном в аналогичных условиях в отсутствие аминокислоты в растворе), свидетельствующие о низкой степени кристалличности. Весьма примечательно, что вхождение аминокислоты приводит к повышению эффективной растворимости апатита: концентрация кальция и фосфата в растворе, сосуществующем с такими кристаллами, выше, чем для беспримесного гидроксилapatита. (При адсорбции, отметим, картина иная: концентрация фосфата в растворе увеличивается, а кальция – уменьшается.) Авторы [380] не обсуждают вероятные причины повышенной растворимости апатита с примесью аминокислоты. Можно предположить, что вхождение аминокислоты в кристалл способствует его дефектности, а это, в свою очередь, приводит к повышенным значениям растворимости.

Кристаллы гидроксилapatита, содержащие различные количества аспарагиновой кислоты, были также получены и детально исследованы в [381], однако *the abstract* статьи не содержит конкретной информации о свойствах этих фаз. В сходном исследовании [382] получены кристаллы гидроксилapatита содержащие до 7.8 wt % аспарагиновой кислоты и до 4.3 wt % глутаминовой.

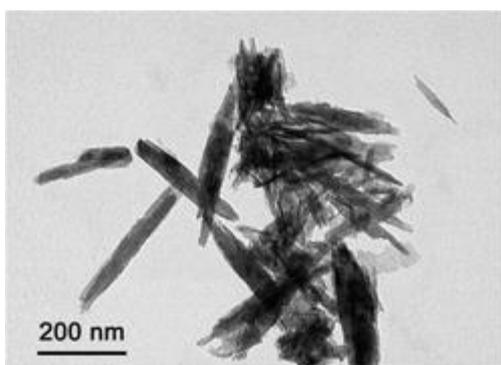


Рис 6-36. Кристаллы гидроксилapatита с примесью полиаспарагиновой кислоты. Из работы [384].

В работе [384] изучены кристаллы гидроксилapatита с примесью полиаспарагиновой кислоты, Рис. 6-36. Кристаллы, содержащие до 8 % wt полиаспарагиновой кислоты, были получены осаждением апатита из водных растворов, содержащих полианион. Рентгенограммы кристаллов свидетельствуют о низкой степени кристалличности, причём длина когерентности быстро увеличивается при нагревании до 400-1100° С. Анизотропный характер восстановления длины когерентности при нагревании позволил авторам [384] сделать вывод, что молекулы полианиона вытянуты вдоль оси z кристалла.

6.3.7.2. Адсорбция стазерина и других содержащихся в слюне фосфопротеинов гидроксилапатитом.

В слюне содержатся белки, проявляющие высокое сродство к гидроксилапатиту, эффективно ингибирующие его кристаллизацию и растворение. Из них наиболее известны стазерин (statherin) и группа богатых пролином фосфопротеинов, в литературе фигурирующих под названием *proline-rich phosphoproteins* (PRPs). Все они содержат остатки фосфосерина и значительное количество отрицательно заряженных (т.е. кислотных) аминокислотных остатков, локализованных на *N*-конце молекулы, тогда как их *C*-концы составлены главным образом из нейтральных аминокислотных остатков, [385-388]. Среди этих белков стазерин был исследован с беспрецедентной детальностью, главным образом усилиями Джеффри Грэя (Jeffrey Gray) и сотрудников его лаборатории в Johns Hopkins University. В этих работах взаимодействие боковых цепей аминокислот с апатитом изучалось методами калориметрии и спектроскопии ЯМР высокого разрешения, а также исследованием влияния искусственных мутаций на изотермы и термодинамику адсорбции. Авторами был обнаружен ряд интересных явлений, не все из которых могли быть объяснены.

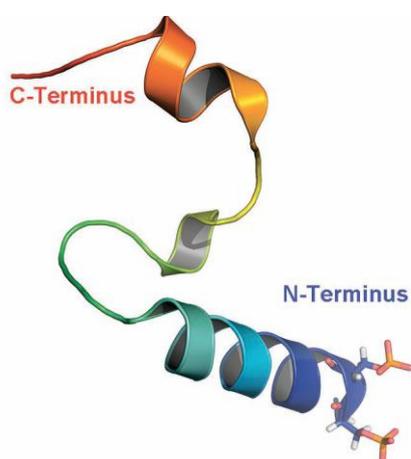


Рис 6-37. Одна из вероятных конформаций стазерина на поверхности апатита. Показаны два фосфосериновых остатка вблизи *N*-конца, Sep1 и Sep2.
Из работы [386]

Стазерин – это небольшой белок (43 аминокислотных остатка, DpSpSEEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVPPEQLYPQPYQPQYQQYTF, символом pS обозначен фосфосерин) содержащийся в слюне, ингибирующий нуклеацию и кристаллизацию гидроксилапатита в полости рта. Слюна, в норме, пересыщена ионами PO_4^{3-} и Ca^{2+} в отношении гидроксилапатита, и это необходимо для предотвращения резорбции зубной эмали. Ингибируя нуклеацию и кристаллизацию гидроксилапатита, стазерин предотвращает образование апатитового налёта на зубах [388,389]. Кроме того, стазерин играет роль смазки на зубах, препятствуя налипанию пищи, [390]. Тем самым, активность стазерина имеет принципиальное значение для нормального функционирования зубов.

Способность стазерина связываться с апатитом, как уже было сказано, обусловлена свойствами кислотного *N*-конца белковой молекулы. В то же время, его способность служить смазкой зубной эмали, согласно авторам [390], есть результат амфифильности белка, возникающей вследствие контраста между его отрицательно заряженным *N*-концом и электронейтральным гидрофобным *C*-концом.

Изотермы адсорбции. Влияние мутаций и фрагментации молекулы стазерина на сорбцию. Адсорбция стазерина апатитом была тщательно изучена, как для молекулы белка, так и для нескольких её фрагментов. Было также изучено влияние искусственных мутаций на адсорбцию, [385,389,391,392,393].

Одна из особенностей стазерина в том, что заряженные аминокислотные остатки распределены в его молекуле неравномерно. Все (кроме одного) отрицательно заряженных аминокислотных остатка – аспартат, глутамат и фосфосерин – сосредоточены в первой трети молекулы. Там же расположены и четыре положительно заряженных аминокислотных остатка, причём положительно заряженные следуют за отрицательно заряженными. Остальные две трети молекулы состоят, главным образом, из электронейтральных гидрофобных аминокислотных остатков.

В работах [385,389] найдено, что содержащий заряженные аминокислотные остатки фрагмент 1-15 (DpSpSEEKFLRRIGRFG, далее в этом разделе будет обозначаться как SN15) взаимодействует с гидроксилapatитом интенсивнее самого стазерина и всех других его фрагментов. Такие фрагменты, как 5-15 (лишённый большей части отрицательно заряженных аминокислотных остатков, 15-29 (из середины молекулы), 29-43 и 19-43 (с C-конца молекулы) высокого сродства к апатиту не обнаруживают. Этим доказана основополагающая роль отрицательно заряженных остатков в связывании.

Кроме того, фрагмент, полученный дефосфорилированием SN-15 (т.е. при замене фосфосериновых остатков сериновыми) на 90% утрачивает сродство к гидроксилapatиту. Однако, если в таком фрагменте остатки серина заменить на остатки аспарагиновой кислоты, то сродство к гидроксилapatиту восстанавливается на 70% от соответствующего значения для SN-15. Тем самым замена фосфатной группы на гидроксил приводит к утрате сродства, а замена её на карбоксильную группу – лишь к уменьшению сродства, не столь существенному. Этот важный результат указывает на определённую взаимозаменяемость фосфатных и карбоксильных групп при хемосорбции.

После того, как основополагающая роль отрицательно заряженных аминокислотных остатков стазерина в адсорбции была доказана, был поставлен вопрос о роли положительно заряженных остатков. В молекуле стазерина, напомним, несущие заряд аминокислоты все расположены в пределах первых 15-ти остатков N-конца молекулы, причём все четыре положительно заряженных остатка следуют за отрицательно заряженными.

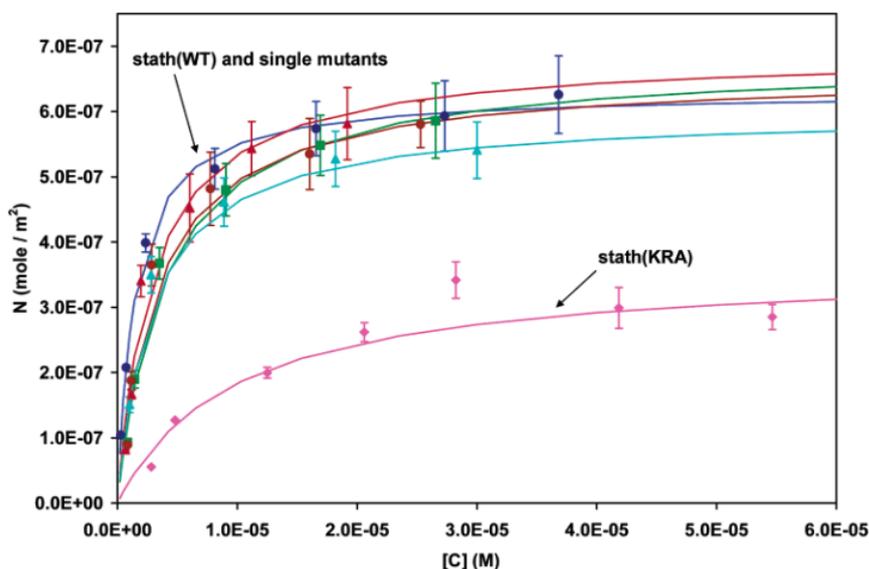


Рис 6-38. Изотермы адсорбции природного и модифицированных стазеринов гидроксилapatитом при 25 °С. Тёмно-голубая линия соответствует природному стазерину. Четыре других группирующихся около той же линии соответствуют стазеринам, полученным заменой одной из его четырёх основных аминокислот на аланин. Лиловая линия внизу представляет изотерму адсорбции стазерина, в котором все четыре основных аминокислотных остатка заменены на аланин.
Из работы [393].

Для решения поставленной задачи в работе [393] были построены изотермы адсорбции для модифицированных стазеринов, в которых один из четырёх основных остатков, K6, R9, R10 и R13, или же все четыре сразу, заменялись неполярным остатком аланина. Полученные изотермы адсорбции представлены на Рис. 6-38. Как можно видеть, замена остатка одной основной аминокислоты на аланин не приводит к существенному изменению кривой сорбции. Одновременная замена всех четырёх основных аминокислотных остатков аланином сопровождается значительными изменениями: сродство молекулы к апатиту уменьшается примерно в пять раз, и вдвое уменьшается поверхностная концентрация насыщения. Тем самым, замена всех четырёх основных остатков приводит к существенному уменьшению сорбционной способности апатита, однако этот эффект несопоставим с обсуждавшейся выше потерей сродства стазерина к гидроксилapatиту, наблюдаемой при модифицировании первых пяти кислотных остатков его N-конца.

Авторы [393] обращают особое внимание на уменьшение поверхностной плотности адсорбированных молекул при заменах всех положительно заряженных остатков на нейтральные. Физиологическая роль этих остатков, как полагают авторы, заключается в создании эффекта притяжения между соседними молекулами стазерина на поверхности апатита, возникающего за счёт электростатического притяжения между положительно заряженными остатками одной молекулы и отрицательно заряженными остатками другой. Взаимное притяжение между молекулами природного стазерина на поверхности апатита, по их мнению, ведёт к увеличению сродства молекул к минералу и увеличению поверхностной плотности насыщения. Позже этими же авторами было выполнено исследование [394], посвященное спектрам ЯМР и калориметрии адсорбированного апатитом стазерина. Было установлено, что положительно заряженные аминокислотные остатки взаимодействуют с фосфат-анионами на поверхности минерала, а не с карбоксильными группами. В результате авторам от изложенной здесь идеи пришлось отказаться, и вклад положительно заряженных аминокислотных остатков в связывание стазерина с апатитом объяснён не был.

Взаимосвязь конформации стазерина и сорбции; влияние обезвоживания. Помимо адсорбции, авторы [389] проанализировали данные спектроскопии кругового дихроизма различных фрагментов стазерина в нескольких полярных и неполярных растворителях и обнаружили у фрагмента SN-15 явно выраженную склонность скручиваться в α -спираль. Остальные фрагменты, в том числе и укороченный отрезок N-конца стазерина, такой структуры не обнаруживают. На этом основании авторы высказали предположение о связи спиральной конформации отрицательно заряженного N-конца стазерина с его способностью адсорбироваться апатитом. Экспериментальная проверка этого предсказания методами спектроскопии ЯМР не только подтвердила, что спиральная конформация молекулы стазерина составляет одно из условий адсорбции, но и продемонстрировала, несколько неожиданным образом, что связывание молекулы белка с апатитом может быть утрачено в отсутствие жидкой воды.

В работе [395] исследовались ЯМР спектры образцов фосфорилированного гексапептида DpSpSEEK (первые шесть аминокислотных остатков N-конца стазерина) адсорбированного гидроксилapatитом. Полученные оценки межатомных расстояний показали, что пептид находится в удлинённой конформации, а не α -спирали. Однако в последующих публикациях тех же авторов было показано, что удлинённая конформация является следствием лиофилизации.

Лиофилизацией называют высушивание замороженных образцов в вакууме. При исследовании спектров ЯМР увлажнённых образцов апатита, адсорбированного стазерина и его фрагменты, обнаружилось, что N-конец имеет конформацию α -спирали. Первые шесть остатков скручены в плотную α -спираль, расстояние pS3–F7 составляет 4.2 Å. Для следующих шести остатков спираль более вытянутая, расстояние L8–G12 равно 4.8 Å.

При лиофилизации структура α -спирали первых шести остатков утрачивается и расстояние pS3–F7 увеличивается, но расстояния и углы связей в позициях 7–12 остаются неизменными, [396]. Способность N-конца стазерина скручиваться в спираль при связывании с гидроксилapatитом, как оказалось, является свойством белковой молекулы как целого: N-конец адсорбированного (увлажнённым) апатитом фрагмента SN-15 вытянут, спиральная структура в нём начинается лишь на седьмом аминокислотном остатке, [397].

В последующей работе [398] было обнаружено, что при лиофилизации связывание молекулы с апатитом утрачивается не полностью. Исследовав динамические характеристики боковых цепей стазерина и его фрагмента SN15 методами ЯМР, авторы цитируемой работы обнаружили монотонное увеличение подвижности атомов углерода от N-конца к С-концу. Исследование остатков в позициях 1–6 показало, что оба фосфосерина на N-конце, судя по их характеристикам, химически связаны с поверхностью кристалла, и они остаются связанными при лиофилизации. В то же время, характер взаимодействия соседствующих с фосфосеринами аспартата и двух глутаматов меняется при лиофилизации, вследствие утраты связи с поверхностью кристалла.

Подводя итог, данные спектроскопии ЯМР полученные в [395,398,397] подтвердили предположение авторов [389], что N-конец молекулы стазерина имеет конформацию α -спирали при адсорбции, и что эта конформация составляет одно из условий адсорбции, а также выявили и важную роль молекул воды в адсорбции. При обезвоживании конформация α -спирали утрачивается, карбоксильные группы молекулы утрачивают сцепление с поверхностью минерала, хотя фосфатные группы её фосфосеринов остаются связанными с поверхностью. Остаётся неясным, утрачивает ли адсорбированная молекула связь с поверхностью кристалла вследствие охлаждения или обезвоживания – лиофилизация является комбинацией охлаждения с обезвоживанием. Возможность утраты связи адсорбированной молекулы с кристаллом при охлаждении и обезвоживании необходимо учитывать при планировании экспериментов по абиогенной полимеризации нуклеотидов.

Интересные данные были получены в [399] при исследовании конформация С-конца стазерина. Для растворённого в воде стазерина этот конец не имеет чётко выраженной структуры. Однако при адсорбции гидроксилapatитом С-конец стазерина сворачивается в α -спираль. Известно, что вызывающие кариес бактерии избирательно связываются со стазеринном, адсорбированным зубной эмалью, но не проявляют интереса к стазерину растворённому в слюне. Известно также, что бактерии распознают остатки L29–F43 С-конца стазерина. Способность бактерий отличить адсорбированный стазерин от растворённого авторы [399] объясняют различием конформаций С-концов растворённой и адсорбированной форм этого белка.

Взаимодействие заряженных аминокислотных остатков стазерина с апатитом, согласно данным ЯМР. Важные сведения о роли положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков в связывании стазерина с апатитом была получена в работах [340,397,394,393] методами многоядерной спектроскопии ЯМР.

Напомним, способность стазерина связываться с апатитом, согласно результатам обсуждённых выше исследований изотерм адсорбции этого белка и его фрагментов, обусловлена свойствами его первых пяти кислых аминокислотных остатков: двух остатков фосфосерина и трёх остатков глутаминовой кислоты. Методами спектроскопии ЯМР могут быть исследованы лишь взаимодействие карбоксильных групп с апатитом, поскольку ЯМР-спектры фосфатных групп двух остатков фосфосерина, к сожалению, оказались неотличимы от спектров фосфат-анионов гидроксилapatита. Для глутаматов E4, E5 и E26 авторы [340] смогли измерить расстояние от углерода $^{13}\text{C}_\alpha$ карбоксильной группы до ^{31}P ближайшего фосфата в апатите. Как оказалось, для E4 и E26 это расстояние превосходит 6.5Å, а для E5 оно оказалось равным 4.25Å. Тем самым, остаток E5 N-конца

стазерина активно взаимодействует с поверхностью сорбента, а E4 и E26 непосредственного участия в связывании не принимают.

Сразу отметим, неучастие остатков E4 и E26 в связывании в действительности может быть артефактом. Хотя авторы использовали увлажнённые образцы, спектры снимались при температуре значительно ниже физиологической (съёмка спектров проводилась при -35°C). Авторы цитируемой работы, очевидно, не принимали во внимание того, что остатки E4 и E26 могли утратить связь с поверхностью кристалла вследствие замораживания.

Исследование спектров ЯМР выявило признаки участия положительно заряженных аминокислотных остатков стазерина в связывании его с апатитом. На основании калориметрических данных, напомним, авторами цитируемых работ было высказано предположение, что остатки четырёх положительно заряженных аминокислот, лизина K6 и аргинина R9, R10, R13, связываются с карбоксильными группами соседних молекул стазерина для уменьшения электростатического отталкивания между молекулами. Однако исследование спектров ЯМР показало, что три из четырёх основных аминокислотных остатков стазерина, подобно кислотным, тоже активно взаимодействуют с поверхностью сорбента. Активное участие лизина K6 во взаимодействии следует из данных [397], согласно которым первые шесть аминокислотных остатков фрагмента SN-15 взаимодействуют с гидроксилapatитом сильнее, чем следующие шесть. Вывод об активном участии двух остатков аргинина, R9 и R10, в связывании был сделан позднее, в работе [394]. Авторы, исследовав спектры ЯМР аргининовых остатков адсорбированного стазерина, смогли определить расстояния от атома $^{13}\text{C}_{\zeta}$ аргининов (т.е. атома углерода гуанидина) до ближайшего ^{31}P на поверхности апатита. Для R9 и R10 расстояния оказались равны 4.62\AA и 4.53\AA , соответственно, и это указывает на их активное взаимодействие с поверхностью, в то же время остаток R13 удалён сильнее и во взаимодействии с поверхностью не участвует.

Примечательно, что полученные два расстояния $^{13}\text{C}_{\zeta} - \text{P}^{31}$ для остатков аргинина R9, R10 практически совпадают с расстоянием $^{13}\text{C}_{\delta} - \text{P}^{31}$, полученным ранее для глутамата E5 (4.25\AA , см. выше). Поскольку основной E5 притягивается отрицательно заряженным фосфатом, а кислотные R9 и R10 притягиваются положительно заряженными ионами Ca^{2+} , и отталкиваются фосфатом, возникает вопрос: каким образом соответствующие атомы углерода всех трёх остатков оказались на одном и том же расстоянии от атома фосфора? (Сами авторы [394] такого вопроса не задают.) Далее, сходство расстояний предполагает примерно равную степень участия в связывании. Однако, обсуждавшиеся ранее экспериментальное исследование изотерм сорбции природного и модифицированного стазерина гидроксилapatитом убеждают в обратном.

Указания на то, что положительно заряженные аминокислотные остатки не вносят значительного вклада в связывание стазерина с апатитом, были получены также в работе [393], при изучении спектров ЯМР модифицированного стазерина, в котором положительно заряженные остатки заменяли на нейтральный аланин. Сравнение динамических и структурных характеристик адсорбированной апатитом молекулы природного стазерина, оцененных из спектров ЯМР, с аналогичными характеристиками модифицированных молекул показало, что ни замена одного из K6, R9, R10 и R13 на остаток аланина, ни замена всех четырёх сразу не приводит к измеримым изменениям характеристик адсорбированной молекулы. Тем самым, при указанных заменах молекула стазерина не утрачивает спиральной конформации, необходимой для адсорбции.

Калориметрические данные. Термодинамика сорбции стазерина гидроксилapatитом была исследована методом изотермического калориметрического титрования (ИТС) в работе [392]. В этой же работе были опубликованы изотермы адсорбции стазерина. Первоначально авторы намеревались построить термодинамическую модель адсорбции

стазерина гидроксилапатитом, основываясь сразу на двух источниках информации – кривых ИТС и изотермах адсорбции. Сделать этого им не удалось, потому что результаты термодинамического моделирования изотермы адсорбции оказались несопоставимы с результатами калориметрических замеров. Оценки модельных параметров, полученные двумя методами, отличались на порядок величины.

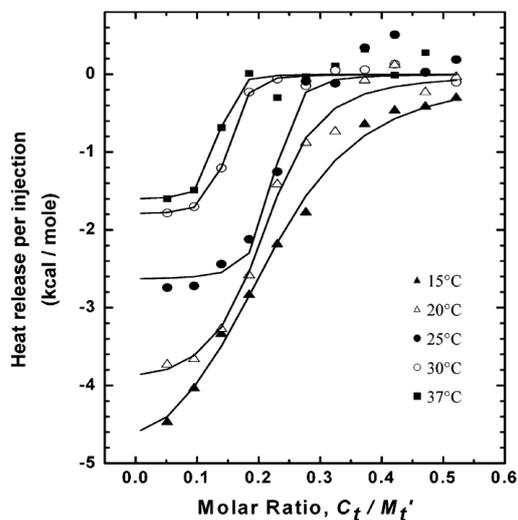


Рис 6-39. Энтальпии адсорбции стазерина гидроксилапатитом по данным изотермического калориметрического титрования. Значения энтальпии для 15-37°C показаны как функции валовой концентрации стазерина в системе, C_t , поделённой на молярную концентрацию центров сорбции на поверхности кристаллов гидроксилапатита, M_t' . Из работы [392].

Полученные авторами графики энтальпии адсорбции при 15-37°C (кривые ИТС исправленные на теплоту разведения стазерина) показаны на Рис. 6-39. При низких концентрациях, адсорбция стазерина протекает экзотермически, с небольшой удельной энтальпией сорбции (порядка 3 kcal/mol). Однако, после заполнения примерно 30% доступных центров сорбции, энтальпия адсорбции уменьшается до нуля. В то же время удельная энтропия сорбции положительна и имеет большую величину ($\geq 23 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) во всём диапазоне составов. Именно энтропия является движущей силой сорбции при всех изученных температурах. Кроме того, энтропия адсорбции обнаруживает тенденцию к возрастанию – увеличивается в четыре раза при повышении температуры от 15 до 37° С.

Высокое значение энтропии может быть объяснено выделением частиц в раствор в процессе адсорбции. Авторы [392] предположили, что источником энтропии может быть высвобождение молекул воды, адсорбированных поверхностью гидроксилапатита и белка.

Отметим, предположение авторов о десорбции молекул воды с поверхности апатита и стазерина как о движущей силе адсорбции стазерина противоречит обсуждённым выше данным ЯМР, согласно которым положительно и отрицательно заряженные аминокислотные остатки стазерина расположены практически на одном и том же расстоянии от поверхности минерала. Если бы десорбция воды была ответственна за связывание стазерина с апатитом, то и вклад обоих типов аминокислотных остатков в энергетику адсорбции стазерина был бы одинаков. Однако, согласно данным, полученным в более поздней работе [393] того же коллектива авторов, всё обстоит в точности наоборот. В работе [393], методом изотермического калориметрического титрования, были измерены энтальпии адсорбции модифицированного стазерина гидроксилапатитом. Как и в других (обсуждённых выше) опытах, посвященных исследованию влиянию основных аминокислот на адсорбцию стазерина, авторами были изучены стазерины, в которых один из остатков K6, R9, R10 и R13 или все четыре сразу заменены на электронейтральный остаток аланина. Авторы пришли к выводу, что вклад основных аминокислот в энтальпию адсорбции стазерина ниже порога чувствительности метода. В то же время, определяющий вклад кислотных аминокислот, сосредоточенных на N-конце стазерина, в термодинамику сорбции сомнений не вызывает, поскольку их удаление или замена на нейтральные остатки многократно уменьшает средство белка к апатиту.

Протонирование составляет ещё один аспект адсорбции стазерина гидроксилапатитом, важный для понимания её механизма, исследованный в [392]. Связывание белка с поверхностью минерала, в принципе, может происходить с поглощением или выделением некоторого количества протонов. Существует изящная калориметрическая методика, описанная например в [341], позволяющая оценить число протонов участвующих в реакции. Калориметрическое титрование проводят в идентичных условиях, используя несколько разных буферов с существенно различающимися энтальпиями ионизации. Число протонов равно угловому коэффициенту прямой, описывающей зависимость энтальпии исследуемой реакции от энтальпии ионизации буфера. Выполнив калориметрическое титрование адсорбции стазерина гидроксилапатитом в трёх разных буферах, авторы [392] показали, что при 25° С и рН 7.4 связывание белка с поверхностью протекает с присоединением в точности одного протона.

Механизм связывания стазерина с апатитом. Реалистическая схема адсорбции стазерина гидроксилапатитом должна объяснить следующие экспериментальные факты:

- (1) белок содержит остатки кислотных и основных аминокислот удалённых на одно и то же расстояние – 4.5-4.6Å от ближайшего атома фосфора на поверхности кристалла, несмотря на то, что первые должны отталкиваться фосфатом, а вторые – притягиваться.
- (2) Находясь на равном удалении от фосфора, кислотные остатки аминокислот вносят определяющий вклад во взаимодействие, а вклад основных остатков намного меньше.
- (3) Фосфатные группы (фосфосерин) взаимодействуют с гидроксилапатитом интенсивнее чем карбоксильные группы, и образуемая связь прочнее, не утрачивается при высушивании (лиофилизации), тем не менее, наблюдается определённая взаимозаменяемость карбоксильных и фосфатных групп при сорбции.
- (4) Энтропия адсорбции ΔS является движущей силой процесса, т.е. $\Delta G \approx -T\Delta S$, причём ΔS быстро увеличивается с ростом температуры от 15 до 37° С.
- (5) Остаток глутаминовой кислоты E4, согласно экспериментальным исследованиям адсорбции [385, 389], должен принимать непосредственное участие в связывании белка с минералом. Однако расшифровка спектров ЯМР (полученных при -35° С) показала отсутствие такого взаимодействия, [340].
- (6) Адсорбция молекулы стазерина протекает с присоединением протона.
- (7) Замена всех четырёх положительно заряженных аминокислотных остатков стазерина на электронейтральный аланин существенно изменяет характер взаимодействия адсорбата с поверхностью, что проявляется в изменении изотермы адсорбции (уменьшается как сродство молекулы к поверхности минерала, так и поверхностная концентрация насыщения). Однако эта же замена никак не сказывается на величине энтальпии адсорбции (измеренной калориметрическим титрованием) во всём диапазоне составов.

Для объяснения перечисленных фактов надо, прежде всего, отказаться от постулируемого авторами цитируемых работ положения, что расстояние от атома углерода боковой цепи белка до ближайшего атома фосфора в апатите (оцененное из спектров ЯМР) равно расстоянию, на которое этот углерод удалён от поверхности кристалла. Имеющиеся данные могут быть объяснены, если, отказавшись от этого постулата, предположить, что карбоксильные группы и аминокислотные группы, участвующие в связывании, находясь на одинаковом расстоянии от ближайшего атома фосфора, занимают, тем не менее, принципиально разные позиции относительно поверхности.

Предположим, что сорбирующая грань кристалла вымощена, преимущественно, фосфат-анионами и несёт отрицательный заряд. Кислотные аминокислотные остатки стазерина связываются с поверхностью гидроксилапатита, встраивая свои фосфатные и карбоксильные группы в позиции тетраэдров PO_4 на поверхности кристалла, образуя ионные связи с атомами кальция в решётке минерала (находящимися под поверхностью).

В то же время несущие положительный заряд аминокислоты располагаются над отрицательно заряженной поверхностью минерала. Тем самым их притяжение гранью, электростатической природы, тоже вносит вклад в удержание белка на поверхности кристалла.

Для проверки, можно сравнить основанную на данных ЯМР оценку расстояния $^{13}\text{C}_\delta - ^{31}\text{P}$ для глутамата Е5 стазераина с расстоянием между двумя атомами фосфора в структуре апатита. Согласно [340], расстояние между ядром $^{13}\text{C}_\delta$ в карбоксильной группе и ядром ^{31}P в фосфате апатита равно 4.25 Å. Если в качестве сорбирующей грани выступает (10 $\bar{1}0$), карбоксил локализован в позиции тетраэдра PO_4 на поверхности грани, а ближайший фосфат расположен в глубине кристалла, то соответствующее $d_{\text{P-P}}$ в структуре (гексагонального) апатита составляет

$$d_{\text{P-P}} = \sqrt{(a/3)^2 + (c/2)^2}.$$

Подставляя значения параметров решётки гидроксилapatита $a = 9.41 \text{ Å}$ и $c = 6.88 \text{ Å}$, получаем $d_{\text{P-P}} = 4.65 \text{ Å}$, что лишь на 0.4 Å превосходит измеренное расстояние $^{13}\text{C}_\delta - \text{P}^{31}$. Тем самым, данные ЯМР спектроскопии [340] согласуются с предположением, что карбоксильные группы аминокислот связывающихся с поверхностью гидроксилapatита встраиваются в позиции тетраэдров PO_4 , так что атом углерода C_δ карбоксильной группы располагается в центре тетраэдра со смещением примерно 0.5 Å в направлении одного из его рёбер.

Переходя к интерпретации калориметрических данных, значительный энтропийный эффект, свидетельствующий о высвобождении частиц при адсорбции стазераина, может быть объяснён вытеснением фосфат-ионов в раствор. Связывание одной молекулы белка с поверхностью минерала посредством встраивания фосфатных и карбоксильных групп в позиции тетраэдров PO_4 , должно приводить к вытеснению до пяти остатков ортофосфорной кислоты в раствор. Тем самым, предлагаемый механизм сорбции объясняет и результаты калориметрического титрования.

Рассмотрим теперь вероятную причину четырёхкратного возрастания энтропийного эффекта адсорбции при возрастании температуры в сравнительно узком диапазоне, 15°-37°С. Этот эффект может быть объяснён, если предположить, что карбоксильные группы испытывают десорбцию при охлаждении. Если охлаждённый образец апатита со стазеринном нагреть, то карбоксильные группы кислых аминокислотных остатков должны встроиться в позиции тетраэдров PO_4 апатита. Поскольку взаимодействие каждой из карбоксильных групп с апатитом должно иметь индивидуальные особенности, отражающие локальные особенности белковой молекулы, встраиваться в позиции PO_4 они будут не все сразу, а по одной, каждая при своей определённой температуре. Тем самым, в некотором диапазоне температуры число встроённых карбоксильных групп должно увеличиваться при нагревании, а потому и энтропия, в первом приближении пропорциональная числу высвобождаемых ортофосфатов, должна возрасти в соответствующее число раз. При этом все карбоксильные группы должны быть уже соединены с апатитом при 37° С, потому что стазерин, являясь продуктом эволюции, должен функционировать при физиологических температурах. В силу вышесказанного, калориметрическое титрование суспензии апатита стазеринном, выполненное при относительно низкой температуре, скажем 15° С, зафиксирует тепловой эффект соединения лишь нескольких кислотных групп молекулы с апатитом, скорее всего только фосфатных. Титрование же при 37° С зафиксирует тепловой эффект соединения всех кислотных групп стазераина с апатитом. В этом, вероятно, и кроется причина упоминавшегося выше четырёхкратного возрастания энтропии адсорбции стазераина апатитом при увеличении температуры от 15 до 37° С.

Обсуждавшийся выше феномен отсоединения карбоксильных групп стазераина от поверхности апатита при лиофилизации тоже может быть связан с десорбцией этих групп в результате охлаждения (предшествующего высушиванию при лиофилизации). Этим же, вероятно, разъясняется следующее противоречие: остаток глутаминовой кислоты E4, согласно экспериментальным исследованиям влияния искусственных мутаций на изотермы адсорбции [385, 389], должен принимать непосредственное участие в связывании белка с минералом. Однако расшифровка спектров ЯМР показала отсутствие такого взаимодействия, [400]. Поскольку адсорбция изучалась при физиологических температурах, а съёмка спектров ЯМР проводилась при -35°C , отсоединение E4 от поверхности кристалла могло произойти в процессе замораживания образца.

Далее, сходство механизмов взаимодействия фосфатных и карбоксильных групп стазераина с поверхностью минерала объясняет их частичную взаимозаменяемость (проявляющуюся в том, что сродство белка к апатиту утрачивается на 90% при замене фосфосерина на серин, но восстанавливается на 70% первоначальной величины при последующей замене серина на аспарагин). В то же время сходство механизмов взаимодействия фосфатных и карбоксильных групп стазераина с апатитом не означает их тождественности. Фосфатная группа несёт на единицу больший положительный заряд и потому её связь с минералом прочнее. По этой причине фосфатные группы адсорбированного апатитом стазераина не утрачивают связи с поверхностью минерала при изменении конформации белка вследствие охлаждения и обезвоживания (при лиофилизации), тогда как карбоксильные группы эту связь утрачивают.

Авторы [397], напомним, источником энтропии адсорбции стазераина полагали сопутствующую ей десорбцию молекул связанной воды с поверхности апатита или белка. Высвобождение молекул воды действительно может иметь место, если адсорбция белка сопровождается изменениями в структуре гидратированного слоя апатита. Признаки фазового превращения в гидратированном слое обнаруживаются при изучении адсорбции апатитом некоторых других соединений с кислотными группами, в первую очередь пирофосфата (см. выше, раздел 6.3.1). Однако имеющиеся данные указывают, что превращение это протекает достаточно медленно, так что равновесие достигается примерно за два дня. Поскольку время, отводимое для одного замера энтальпии в калориметре, не превосходит 10 минут, вытеснение ортофосфат-анионов в раствор кислотными группами белка представляется более реалистичным механизмом возникновения энтропии (фиксируемой при калориметрическом титровании).

Упомянутая выше нестыковка термодинамических моделей адсорбции стазераина, обнаруженная в [392], когда оценки термодинамических параметров, основанные на данных калориметрии, оказались несопоставимы с результатами термодинамического моделирования изотерм адсорбции, может быть объяснена несоответствием временных масштабов экспериментов. Время, отводимое на достижение термодинамического равновесия при построении изотерм адсорбции, измеряется часами, а при калориметрическом титровании – минутами. Поэтому калориметрические данные (Рис 6-39) должны отражать тепловые эффекты быстрого превращения, заключающегося во встраивании кислотных групп в позиции $[\text{PO}_4]^{3-}$, а изотермы адсорбции (Рис 6-38) и полученные из них термодинамические данные отражают суммарный эффект превращения, слагающийся из вытеснения анионов $[\text{PO}_4]^{3-}$ в раствор и выделения молекул воды вследствие превращения, испытываемого гидратированным слоем.

Нестыковкой временных масштабов экспериментов, по-видимому, объясняются и противоречивые данные о вкладе положительно заряженных аминокислотных остатков в энтальпию адсорбции. Напомним, замена всех четырёх положительно заряженных аминокислотных остатков на электронейтральный аланин никак не сказывается на величине энтальпии адсорбции (измеренной калориметрическим титрованием) во всём диапазоне концентраций стазераина в растворе. Однако такая же замена, очевидно, вносит изменения в термодинамические свойства адсорбата, проявляющиеся в изменении

изотерм адсорбции, свидетельствующем об уменьшении и сродства молекулы к апатиту, и поверхностной концентрации насыщения. Результаты калориметрического титрования фиксируют тепловые эффекты начального этапа адсорбции. Согласно предлагаемой схеме, на первом этапе кислотные группы боковых цепей аминокислот помещаются в позиции ортофосфатов на поверхности грани, а находящиеся в них анионы $[\text{PO}_4]^{3-}$ вытесняются в раствор. Поскольку замена положительно заряженных аминокислот на аланин никак не сказывается на кислотных группах, тепловые эффекты первого этапа адсорбции при этом не изменяются. Однако вклад положительно заряженных аминокислот в термодинамику адсорбции проявляется при более полном достижении равновесия в системе, поэтому указанные замены меняют форму изотерм адсорбции.

Нам осталось обсудить вероятный вклад положительно заряженных аминокислотных остатков и протонирования в связывание стазерина с апатитом. Четыре основных остатка, напомним, следуют непосредственно за кислотными остатками N-конца молекулы стазерина. Данные спектроскопии ЯМР указывают на активное взаимодействие аминокислотных групп этих остатков с поверхностью кристалла. Поскольку в предлагаемой нами модели сорбирующая грань кристалла апатита вымощена (преимущественно) ортофосфат-ионами и несёт отрицательный заряд, можно предположить, что положительно заряженные аминокислотные группы притягиваются к отрицательно заряженным фосфатам поверхности, усиливая сцепление молекулы белка с поверхностью кристалла. Однако роль положительно заряженных аминокислотных остатков в связывании этим, вероятно, не исчерпывается.

Напомним, замена всех четырёх положительно заряженных остатков K6, R9, R10 и R13 в стазерине на электронейтральный аланин приводит к изменению формы изотерм адсорбции. Сродство молекулы к апатиту уменьшается примерно в пять раз, и вдвое уменьшается поверхностная концентрация насыщения. (Возможно, тут нелишне пояснить: сродство определяется из наклона изотермы адсорбции в области низких концентраций, а поверхностная концентрация насыщения – это максимальное количество молекул, сорбируемых на единицу площади.) Если бы роль основных остатков сводилась к усилению сцепления молекулы с поверхностью, их удаление уменьшило бы сродство, но не концентрацию насыщения. Для сравнения, дефосфорилирование родственных стазерину белков PRPs примерно в 10 раз уменьшает их сродство к гидроксилapatиту, но при этом концентрация насыщения остаётся прежней, [385].

Сами авторы [393], исследовавшие изотермы адсорбции стазерина, напомним, видели физиологическую роль положительно заряженных остатков в том, чтобы уменьшать отталкивание между адсорбированными молекулами. Идея эта была ими оставлена, когда из данных спектроскопии ЯМР выяснилось, что аминокислотные группы остатков основных аминокислот взаимодействуют не с карбоксильными группами соседних молекул белка, а с фосфатами поверхности кристалла. В действительности же, взаимодействие аминокислотных групп с фосфат-анионами кристалла тоже может создавать эффект притяжения между молекулами и тем самым способствовать увеличению поверхностной концентрации насыщения, если принять схему адсорбции, основанную на вытеснении фосфатов кристалла в раствор.

В самом деле, согласно нашему предположению, сорбирующая грань кристалла апатита вымощена ортофосфат-ионами и несёт отрицательный заряд. Встраивание фосфатных и карбоксильных групп стазерина в позиции тетраэдров PO_4 гидроксилapatита *не должно* приносить дополнительный отрицательный заряд. Поэтому кислотные группы сорбируемого стазерина не создают предпосылок для электростатического отталкивания соседних молекул. В то же время, положительный заряд аминокислотных групп, расположенных непосредственно над фосфат-анионами поверхности, должен до некоторой степени компенсировать несомый фосфатами отрицательный заряд, поэтому электростатическое отталкивание между соседними фосфатами поверхности

должно уменьшиться. Таким образом, присутствие основных аминокислотных остатков должно понижать общую электростатическую энергию поверхности, создавать эффект притяжения между белковыми молекулами. Предлагаемую здесь интерпретацию физиологической роли положительно заряженных аминокислот стазерина можно было бы проверить экспериментально. Эффект притяжения между молекулами должен приводить к развитию (двумерного) дальнего порядка на поверхности кристалла, адсорбированного молекулы стазерина содержащего основные аминокислоты, [402,403]. Дальний порядок должен утрачиваться при замене основных аминокислот на электронейтральный аланин. Соответствующие структурные изменения адсорбированного слоя могут быть зафиксированы методами атомно-силовой микроскопии. В литературе такие данные, к сожалению, отсутствуют.

Выше было упомянуто, что связывание стазерина с поверхностью гидроксилapatита протекает с присоединением протона. Протонирование, вероятно, служит той же цели, что и аминогруппы остатков основных аминокислот – привнесению дополнительного положительного заряда для создания эффекта взаимного притяжения адсорбированных молекул и проистекающего из него увеличения количества адсорбированных молекул на единицу площади поверхности.

Резюмируя, двухстадийная схема адсорбции, в которой на первой, быстрой, стадии кислотные группы сорбируемого белка занимают позиции фосфатов в апатите, а на второй, более медленной, имеет место некое превращение в гидратированном слое апатита, сопровождающееся выделением молекул воды, позволяет объяснить все экспериментальные факты об адсорбции стазерина апатитом. Движущей силой процесса на обеих стадиях служит энтропийный эффект от высвобождения большого числа частиц (сначала фосфатов, затем воды).

Другие фосфопротеины, содержащиеся в слюне. Стазерин – это лишь один представитель группы белков со сходными свойствами, т.н. *proline-rich phosphoproteins* (PRPs). О взаимодействии других PRPs с апатитом известно немного. Подобно стазерину, PRPs связываются с поверхностью минерала при помощи остатков фосфосерина и кислых аминокислот расположенных вблизи N-конца молекулы. В работе [387] показано, что, как и в случае стазерина, энтропия является движущей силой адсорбции белков PRP1, PRP3, а также полиаспарагиновой кислоты гидроксилapatитом.

В работе [404] исследовали влияние ионов Ca^{2+} , Na^+ и Mg^{2+} на сродство слюнных белков к гидроксилapatиту. Добавление ионов Ca^{2+} в слюну способствуют связыванию белков с минералом, ионы Na^+ не оказывают влияния, а ионы Mg^{2+} препятствуют связыванию. В [405] исследовалось влияние фторирования на сродство белков слюны к апатиту. Диски из гидроксилapatита выдерживались в растворе фторида натрия, а затем погружались в слюну. Количество стазерина адсорбированного на единицу поверхности уменьшалось с увеличением концентрации фтора.

6.3.7.3. Взаимодействие амелогенина и остеокальцина с гидроксилapatитом.

Среди белков, обнаруживающих высокое сродство к апатиту, только стазерин был исследован с детальностью, позволяющей делать выводы о механизме адсорбции его поверхностью минерала. Однако, при всём обилии данных, для этого белка, практически ничего не известно о природе сорбирующей грани. К счастью, определённые выводы о природе сорбирующей грани могут быть сделаны для двух других белков – амелогенина и остеокальцина, участвующих в регулировании процессов кальцинирования и, подобно стазерину, связывающихся с поверхностью апатита участками обогащёнными остатками кислотных аминокислот.

Амелогенин играет одну из ключевых ролей в формировании эмали зубов. Созревшая эмаль состоит из волокон карбонатизированного гидроксилапатита со значительной примесью фторапатита. Параллельно ориентированные волокна, от 40 до 60 nm в поперечнике, длиной до нескольких сотен микрон, собраны в стержнеподобные агрегаты шириной порядка 4-6 μm, Рис. 6-40. Имея отношение длины к ширине около 10000, апатитовые кристаллы эмали примерно в 3000 раз длиннее кристаллов минерала кости. Направление удлинения кристаллов совпадает с кристаллографической осью z структуры апатита.

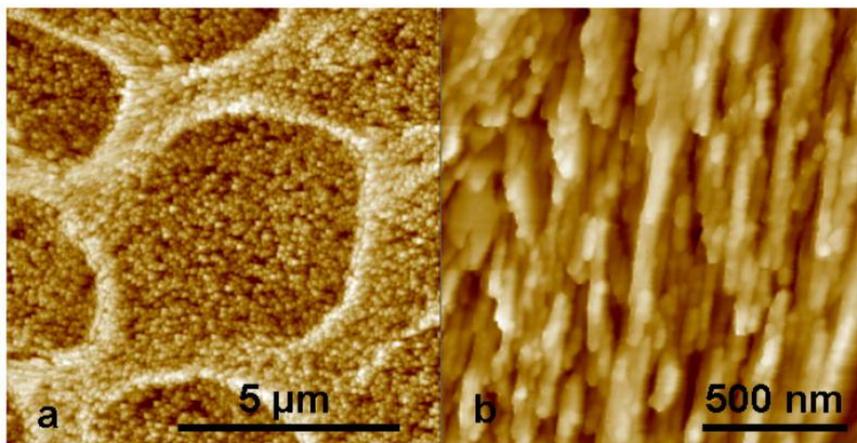


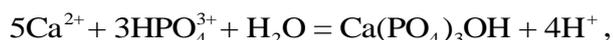
Рис 6-40. Изображение эмали зубов человека полученное с помощью атомно-силовой микроскопии. Хорошо различимы нитевидные кристаллы карбонатизированного гидроксилапатита вытянутые вдоль оси z. (AFM images of the microstructure of human enamel: Key-hole-shaped enamel rods of about 5 μm diameter run from the dentin-enamel junction to the surface of the tooth (a) and are comprised of aligned apatite crystals 40 to 60 nm wide and several hundreds of micrometers long (b).) *Из работы [406].*

Молекулярные механизмы формирования зубной эмали поняты недостаточно, однако в последние полтора десятилетия в этой области был достигнут определённый прогресс, не в последнюю очередь потому, что процесс протекает во внеклеточном пространстве, и это облегчает исследования. В частности, известно, что уникальная структура эмали образуется вследствие специфического взаимодействия апатита с амелогенином, [407].

Молекула амелогенина содержит около 180 аминокислотных остатков, из которых лишь 13 не являются электронейтральными; последние локализуются вблизи С- и N-концов. Размеры и состав молекулы для разных позвоночных могут меняться, однако на С-конце всегда обнаруживается богатый пролином и лейцином кислотный участок TDKTKREEVD. Амелогенин секретируется амелобластами в межклеточное пространство, заполненное т.н. *extracellular matrix*, разделяющее области дентина и формирующейся эмали. Оказавшись в *extracellular matrix*, молекула самопроизвольно сворачивается в наносферу диаметром от 30 до 50 nm. Наносферы, организуясь в цепочки, способствуют образованию удлинённых апатитовых кристаллов, [408]. При сворачивании молекулы, С-конец оказывается на поверхности наносферы, поэтому указанный выше участок TDKTKREEVD считают «ответственным» за специфику взаимодействия белка с апатитом. В то же время, единственный фосфорилированный аминокислотный остаток стазерина, Ser16, – локализован вблизи N-конца и в связывании с апатитом участия принимать не может.

В нескольких лабораториях предпринимались попытки симитировать рост нитевидных кристаллов гидроксилапатита в присутствии амелогенина, но задача оказалась исключительно сложной, требующей обеспечения предельно низких скоростей кристаллизации. Иначе говоря, требуется с высокой точностью поддерживать исключительно низкую степень пересыщения раствора ионами Ca^{2+} и PO_4^{3-} по отношению к гидроксилапатиту. Одновременно необходимо регулировать величину pH.

Кристаллизация апатита протекает с депротонированием гидрофосфата в соответствии с реакцией



и, в отсутствие контроля pH, это приводит к возрастанию кислотности среды.

Значительных успехов в лабораторном моделировании процесса формирования эмали добились авторы [409], создавшие установку для роста кристаллов гидроксилапатита, с беспрецедентной точностью регулируемую указанные выше параметры. Главное же преимущество созданного ими оборудования заключается в возможности поддерживать заданную концентрацию амелогенина с точностью до наномолей. Исследовав различные режимы роста, авторы сумели подобрать условия, в которых образующиеся кристаллы приобретают сходство с кристаллами эмали зубов. Ими получены кристаллы, имеющие вид тонких лент вытянутых вдоль оси z , Рис. 6-41. Тот факт, что направление удлинения кристаллов совпадает с осью z , был подтверждён при исследовании их методами просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения. Тем самым, грань, образующая поверхность лентовидного кристалла, является гранью гексагональной призмы. (Сама грань однозначно идентифицирована не была.)

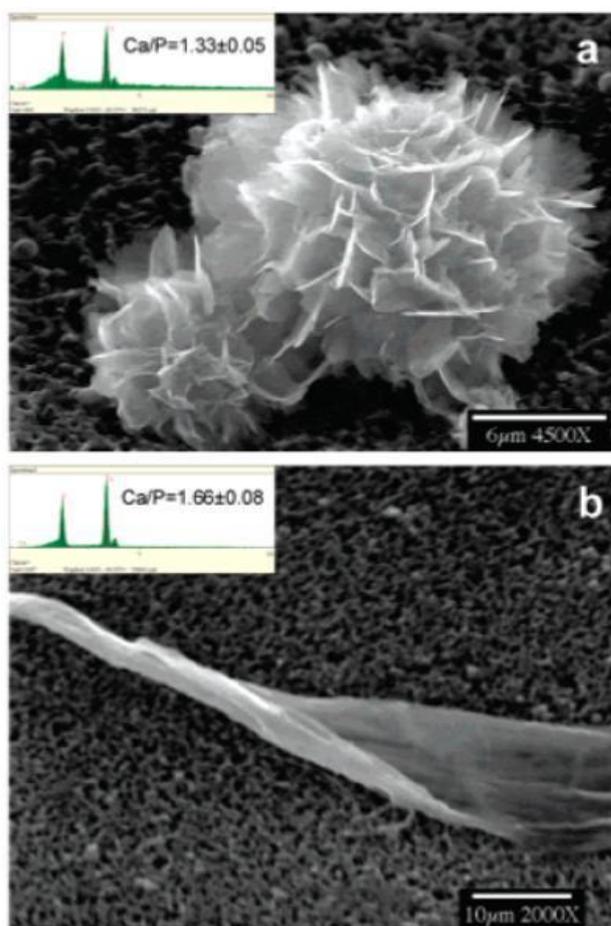


Рис 6-41. Имитация процесса образования эмали в лаборатории. Морфология кристаллов образующихся при осаждении фосфата кальция в области низких пересыщений, в присутствии амелогенина. (а) Контрольный опыт. В отсутствие амелогенина образуются сростки пластинчатых кристаллов октакальциевого фосфата (ОСР $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Изображение получено на сканирующем электронном микроскопе. На врезке показан энергодисперсионный рентгеновский спектр. Отношение $\text{Ca/P} = 1.33$ соответствует ОСР. (b) В присутствии амелогенина образуются апатитовые кристаллы в виде лент. Направление удлинения

кристалла совпадает с осью z . Изображение получено на сканирующем электронном микроскопе. На врезке показан энергодисперсионный рентгеновский спектр. Отношение $Ca/P = 1.66$ соответствует апатиту.

Из работы [409].

Ещё один факт, важный для понимания механизма взаимодействия кислотных белков с апатитом, был выявлен авторами [406], также исследовавшими механизм кристаллизации апатита в присутствии амелогенина. Как оказалось, в этом процессе кальций расходуется в количествах, превышающих его содержание в апатите. Сами авторы полагают, что это быть объяснено образованием комплексов кальция с некоторыми из аминокислотных остатков амелогенина, аспартамовой кислоты например. Не ставя под сомнение правомочность такого объяснения, отметим, что возможно и другое. Расходование Ca^{2+} с повышенной скоростью может быть связано с переходом этого катиона из раствора в гидратированный слой сорбирующей грани кристалла, как то имеет место при адсорбции пирофосфата и бисфосфонатом апатитом, см. раздел 6.3.3.

Остеокальцин (osteocalcin) входит в число т.н. неколлагеновых белков (*noncollagenous proteins*), обнаруживаемых в костной ткани и дентине. Это небольшой белок (49 аминокислотных остатков), принимающий участие в регулировании процесса кальцинирования. Один из механизмов этого регулирования включает в себя химическое связывание белка с поверхностью апатита, [546,411]. Наличие химического сродства остеокальцина к гидроксилapatиту было продемонстрировано экспериментально, [412]. Важную структурную особенность белка составляют три остатка γ -карбоксиглутаминовой кислоты Gla17, Gla21 и Gla24 (номера позиций даны для свиного остеокальцина), предположительно участвующие в связывании его с поверхностью минерала кости.

Косвенное свидетельство высокого сродства остеокальцина к апатиту было получено при исследовании органических молекул, экстрагированных из декальцинированного ребра игуанодона (травоядного ящера) возрастом 120 млн лет, [413]. В одной из фракций были обнаружены молекулы, способные избирательно связываться с антителами против остеокальцина. Авторы полагали, что отдельные фрагменты молекулы остеокальцина смогли сохраниться в окаменелостях благодаря своей способности связываться с апатитом. В ходе последовавшей дискуссии были предъявлены данные о кинетике разложения остеокальцина, исключающие возможность сохранения фрагментов этого белка в течение столь длительного времени. Позднее, в 2000 г, было выполнено исследование [414] термической устойчивости фрагментов молекулы остеокальцина в присутствии измельчённой кости. Как выяснилось, центральный участок молекулы, содержащий остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, обнаруживает аномальную устойчивость в присутствии минерала кости, в то время как другие фрагменты, содержащие С- и N-концы молекулы белка, такой устойчивостью не обладают. Тем самым была подтверждена как способность указанного фрагмента молекулы остеокальцина связываться в аномально устойчивый комплекс с апатитом, так и ведущая роль остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты в связывании белка с минералом.

Исследования фрагментов остеокальциновой молекулы в костях динозавров никак не повлияли на эволюцию бытующих представлений о механизме связывания этого белка с апатитом. До появления, в 2003 г., рентгеноструктурных данных, представления о механизме взаимодействия остеокальцина с биоapatитом базировались всецело на данных о спектроскопии растворов остеокальцина. Согласно данным спектроскопии ЯМР и кругового дихроизма [415], в отсутствие кальция растворённый в воде остеокальцин не обнаруживает четко определённой структуры, однако при физиологических концентрациях кальция он сворачивается в плотную глобулу. На этом основании было высказано предположение, что остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты остеокальцина образуют хелатные комплексы с ионами Ca^{2+} , и что с поверхностью минерала кости остеокальцин связывается по сходному механизму. Впоследствии образование таких комплексов в растворе было продемонстрировано методами ИК-Фурье спектроскопии

[416]. Более того, если модифицировать остеокальцин, заменив остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты на глутамат, то полученный белок способность связываться с ионами Ca^{2+} утрачивает.

Рентгеноструктурный анализ кристаллов свиного остеокальцина [417], выращенных из водного раствора содержащего CaCl_2 , показал наличие плотной глобулярной структуры, в которой прослеживаются три отдельных участка со структурой α -спирали (обозначенные как $\alpha 1$ - $\alpha 3$ на Рис. 6-42(A)). С одной стороны глобулы обнаруживается отрицательно заряженная поверхность, составленная из трёх упоминавшихся выше остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты Gla17, Gla21, Gla24, а также двух аспаргатов Asp30, Asp34.

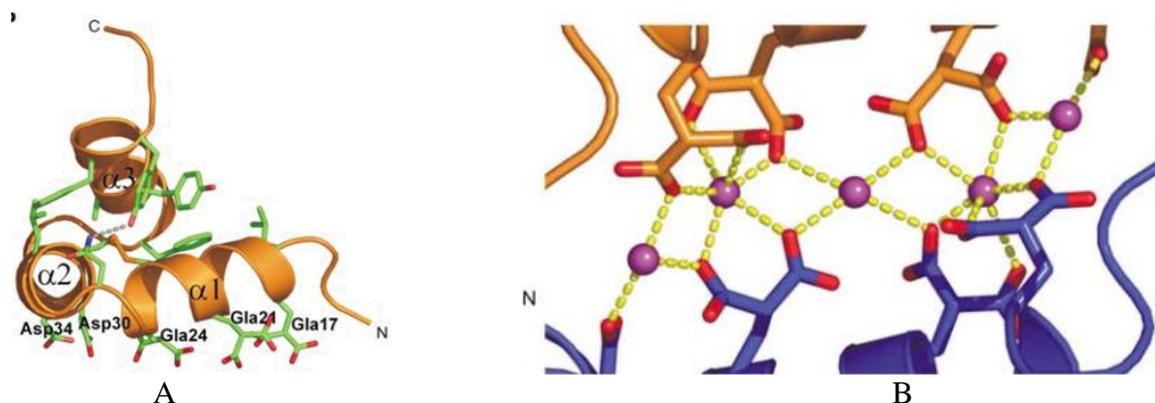


Рис 6-42. Структура свиного остеокальцина по данным рентгеноструктурного анализа. (A) Ленточная диаграмма структуры мономера. Показаны аминокислотные остатки Gla17, Gla21, Gla24, Asp30 и Asp34, координирующие ионы Ca^{2+} , а также гидрофобные остатки, стабилизирующие третичную структуру молекулы. (B) Область сопряжения двух молекул димера, показанных оранжевым и синим, соответственно. Ионы Ca^{2+} представлены фиолетовыми сферами. Жёлтым пунктиром показаны ионные связи.

Примечательная особенность структуры остеокальцина – наличие пяти ионов Ca^{2+} между двумя кристаллографически связанными молекулами стазераина. Ионы координируются кислородами карбоксильных групп аминокислотных остатков Gla17, Gla21, Gla24 и Asp30, при этом их пространственное расположение оказывается очень близким к расположению ионов Ca^{2+} в апатите, Рис. 6-43(b). Перебор различных вариантов ориентации молекулы показал, что указанные пять атомов могут быть вставлены в структуру апатита только если молекула расположена на грани $(10\bar{1}0)$ или $(11\bar{2}0)$ апатита.

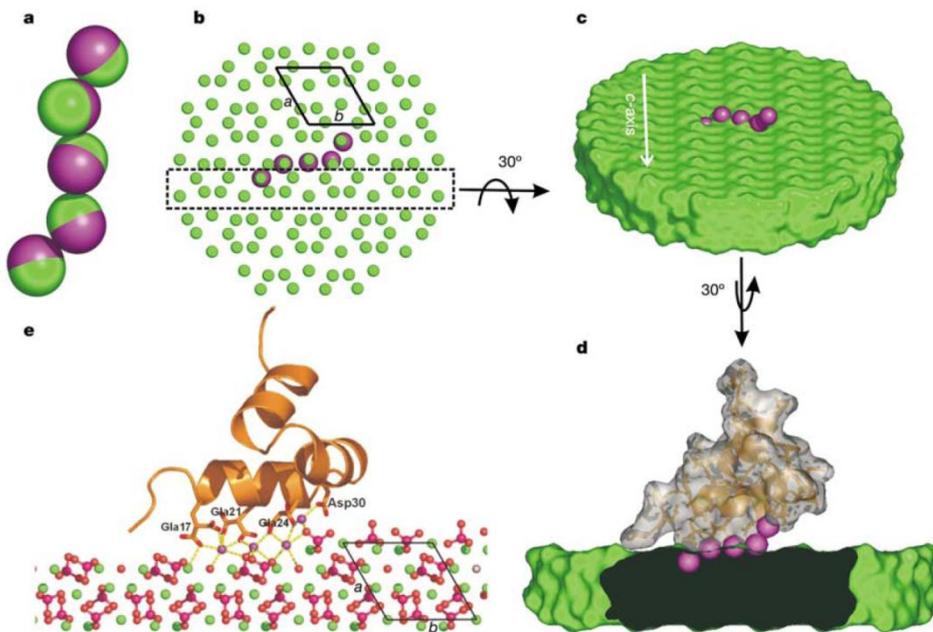


Рис 6-43. Модель взаимодействия остеокальцина с гранью $(10\bar{1}0)$ апатита, предложенная авторами [417] на основе данных о структуре кристаллов остеокальцина.

(a) Сопоставление пространственного расположения пяти атомов Ca в структуре остеокальцина (фиолетовое) и гидроксилапатита (зелёное). (b,c) Расположение координируемых аминокислотными остатками остеокальцина атомов Ca на поверхности грани. Параллелограммом показана проекция элементарной ячейки. Рамкой на **b** выделен фрагмент структуры апатита, показанный на **c**. (d,e) Механизм закрепления белка на поверхности кристалла. *Из работы [417]*

Можно считать доказанным, что остеокальцин взаимодействует с одной из граней гексагональной призмы апатита, поскольку и $(10\bar{1}0)$, и $(11\bar{2}0)$ представляют собой грани призмы. В то же время предложенный авторами механизм взаимодействия белка с кристаллом, показанный на Рис. 6-43, вызывает вопросы. Авторы постулируют, что карбоксильные группы аминокислотных остатков должны взаимодействовать с ионами Ca^{2+} , расположенными *на* поверхности плоской грани кристалла. Но это трудно себе представить, поскольку указанные пять атомов не лежат в одной плоскости, см. Рис. 6-43(d). Кроме того, модель не объясняет назначение кислотного остатка Asp34, показанного на Рис. 6-43. и отсутствующего на Рис. 6-42. Наконец, в рамках предложенной модели остаётся неясным, как «висящий» над кристаллом ион Ca^{2+} локализующийся вблизи Asp34, см. Рис. 6-43 (d) и (e), мог бы поучаствовать в связывании белка с поверхностью. И уж никак нельзя объяснить, почему пространственное расположение этого «висящего» атома должно совпадать с расположением иона Ca^{2+} в апатите.

Указанных противоречий можно избежать предположив, что карбоксильные группы аминокислотных остатков Gla17, Gla21, Gla24 взаимодействуют с ионами Ca^{2+} расположенными *под* поверхностью кристалла, а кислороды карбоксилатов в Asp30 и Asp34 координируют ионы Ca^{2+} непосредственно *на* этой поверхности. Для этого достаточно сместить показанную на Рис. 6-43(b) молекулу остеокальцина вниз на вектор $\frac{1}{3}\mathbf{a}$, погрузив её в кристалл, заместив 8 анионов PO_4^{3-} карбоксильными группами белка.

Расстояние между атомами углерода двух групп COO^- γ -карбоксиглутаминовой кислоты очень близко к расстоянию между двумя ближайшими атомами фосфора в апатите. (Согласно [356], расстояние между атомами углерода двух соседних групп COO^- в цитрате, адсорбированном апатитом кости составляет 0.32 nm, что очень близко к

расстоянию между соседними атомами фосфора в гидроксилapatите, 0.34 nm. Ввиду сходства структуры, расстояние между атомами углерода двух групп COO^- γ -карбокситглютаминовой кислоты тоже должно быть близко к 0.32 nm.)

Заглубленное положение остатков Gla17, Gla21 и Gla24 в грани, при котором каждая их группа COO^- испытывает притяжение со стороны сразу нескольких ионов Ca^{2+} , вероятно, и сообщает аномально высокую устойчивость комплексу остеокальцина с апатитом, позволившую содержащему эти остатки фрагменту в фоссилизованных костях динозавра сохраниться до наших дней.

6.3.7.4. Адсорбция сывороточного альбумина апатитом.

Этот детально изученный и наиболее распространённый белок плазмы крови, часто используемый в качестве удобной модели для исследования свойств глобулярных белков, относится к числу кислотных белков, активно сорбируемых апатитом. На примере бычьего сывороточного альбумина (BSA) многими авторами изучалось влияние различных факторов, таких как состав раствора, состава и форма кристаллов, на сорбцию.

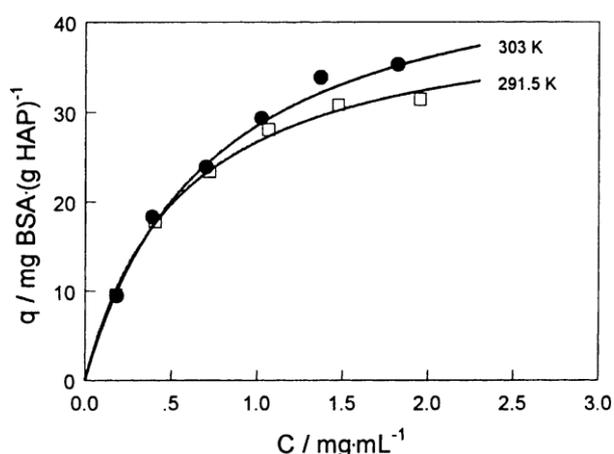


Рис 6-44. Изотермы адсорбции бычьего сывороточного альбумина (BSA) гидроксилapatитом.

Из работы [418].

Изотермы адсорбции BSA были построены в [418] для 291.5 ° и 303° K, Рис. 6-44. Из этих данных по уравнению Ван'т Гоффа были рассчитаны энтальпии адсорбции, оказавшиеся пренебрежимо малыми (в максимуме не превосходят 100 kJ/mol). Отсюда может быть сделан вывод, что энтропийный эффект является наиболее вероятной движущей силой процесса адсорбции. В этой же работе было исследовано влияние концентрации NaCl , PO_4^{3-} и pH на сорбцию, Рис. 6-45. Количество адсорбированного BSA возрастает при увеличении концентрации NaCl и уменьшается при увеличении концентрации PO_4^{3-} , в полном соответствии с общими закономерностями, установленными в апатитовой хроматографии. В сходном исследовании [419] было обнаружено, что повышение концентрации NaCl и CaCl_2 в растворе способствует увеличению количества BSA адсорбированного гидроксилapatитом, причём эффект от добавления CaCl_2 намного превосходит эффект от добавления NaCl . В то же время повышение концентрации Na_2HPO_4 в растворе приводит к уменьшению количества адсорбированного BSA. В *the abstract* статьи [420] содержится упоминание о том, что сродство BSA к гидроксилapatиту резко возрастает при добавлении в раствор BaCl_2 и AlCl_3 .

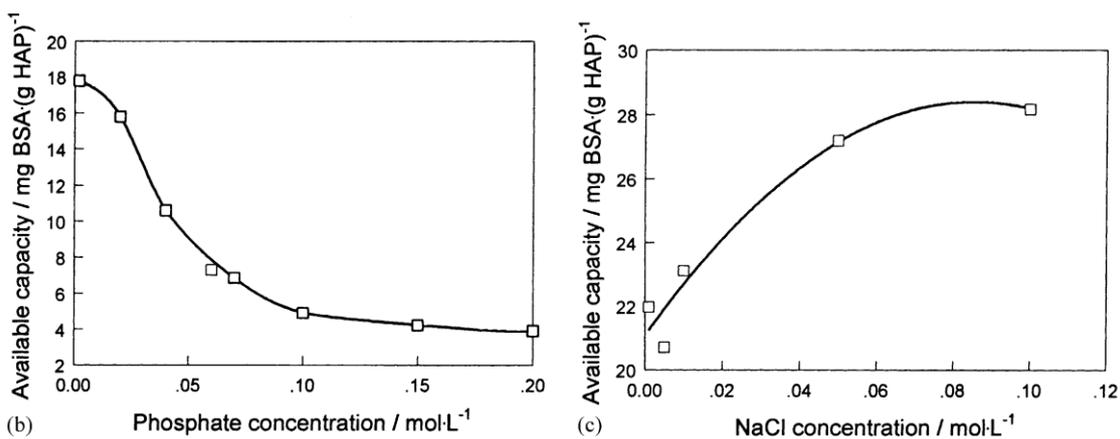


Рис 6-45. Влияние фосфата (слева) и хлорида натрия (справа) на адсорбцию бычьего сывороточного альбумина (BSA) гидроксилапатитом. Во всех экспериментах исходная концентрация BSA в растворе составляла 1 mg/ml. *Из работы [418].*

В литературе также имеются данные о влиянии пирофосфата на адсорбцию BSA апатитом. В частности, недавнем исследовании [421] показано, что в присутствии пирофосфата адсорбция BSA практически блокируется. Если же взвесить гидроксилапатита, предварительно адсорбированного BSA, поместить в раствор пирофосфата, происходит количественное вытеснение адсорбированного белка в раствор.

Существует альтернативная возможность модифицировать поверхность гидроксилапатита пирофосфорной кислотой, обнаруженная в [337], вследствие которой, согласно авторам, поверхность кристалла покрывается разветвлёнными цепями полифосфата. При этом количество адсорбированного BSA возрастает в три раза, однако механизм адсорбции принципиально иной. (Из информации, представленной в *the abstract* нельзя выяснить, на чём основаны выводы авторов о возникновении полифосфатов и их разветвлённости.)

BSA был использован во многих исследованиях адсорбции белков модифицированным апатитом, в котором кальций частично или полностью замещён другими катионами. Имеются данные об адсорбции BSA Sr-гидроксилапатитом [422], или же апатитом, в котором часть Ca^{2+} замещена на Sr^{2+} или Zn^{2+} [423], Al^{3+} , Fe^{3+} , La^{3+} [424], Ti^{4+} [425, 426], и ряд других катионов. Во всех исследованных случаях частичное или даже полное замещение кальция другим металлом не приводит к утрате апатитом способности адсорбировать BSA; в большинстве случаев количество адсорбированного белка увеличивается процентов на сорок, но иногда и уменьшается. Сохранение адсорбционной активности апатитом при столь многообразных заменах в его катионной подрешётке, заметим, противоречит хелатной теории, согласно которой адсорбция имеет место за счёт образования хелатных комплексов, образуемых кислотными группами белка и атомами кальция. В то же время представления, согласно которым кислотные группы размещаются в позициях ортофосфата апатита, вытесняя последние в раствор, с экспериментальными данными согласуются. Очевидно, замены Ca^{2+} на катион, не являющийся хелатообразователем, не должны сказываться радикальным образом на свойствах анионной подрешётки минерала.

На примере BSA было также исследовано влияние термообработки на адсорбционные свойства гидроксилапатита, [427]. Судя по информации, представленной в *the abstract*, сродство BSA к гидроксилапатиту не изменилось после нагрева последнего до 1100°C , хотя количество адсорбированного белка уменьшилось в результате укрупнения кристаллов.

Имеются также данные о влиянии морфологии кристаллов апатита на адсорбцию BSA. Авторы [428] разработали гидротермальный метод получения игольчатых кристаллов

гидроксилапатита, обнаруживающих более высокое сродство к BSA, как они полагают, за счёт увеличения суммарной площади грани (10 $\bar{1}0$).

При осаждении гидроксилапатита из растворов содержащих BSA происходит образование смешанных кристаллов удлинённого габитуса со значительной примесью белка, [429], Рис. 6-46. При растворении таких кристаллов в кислоте высвобождение BSA протекает в две стадии. Сначала имеет место энергичная десорбция BSA поверхностью, а последующее выделение соосаждённого белка контролируется скоростью растворения кристаллов.

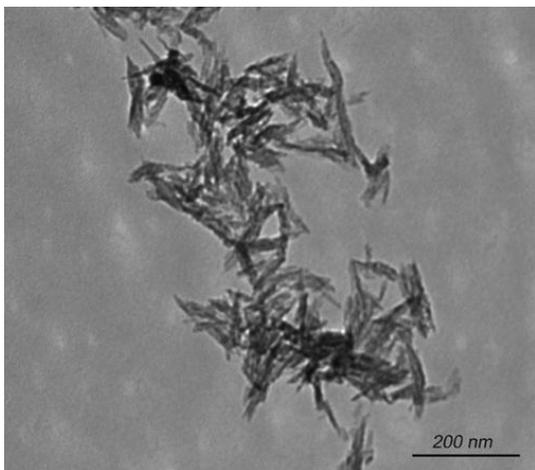


Рис 6-46. Кристаллы гидроксилапатита с примесью бычьего сывороточного альбумина. *Из работы [429]*

6.3.8. Взаимодействие нуклеотидов и полинуклеотидов с апатитом.

В отличие от классов соединений, обсуждённых выше, взаимодействие моно- и полинуклеотидов с поверхностью апатита изучено не столь детально. Связано это может быть с тем, что в живой клетке ДНК и РНК практически никогда не приходят в соприкосновение с апатитом. Адсорбция ряда мононуклеотидов апатитом изучалась в связи с проблемой происхождения жизни. Некоторые полезные сведения обнаруживаются в публикациях, посвященных разработке методов трансфекции. Важные сведения об особенностях взаимодействия ДНК с апатита были выявлены при исследованиях ДНК из костных остатков, выполненных в интересах археологии, антропологии и палеомикробиологии.

Адсорбция мононуклеотидов. Активность взаимодействия нуклеотидов с апатитом уменьшается в ряду нуклеозидтрифосфаты > нуклеозиддифосфаты > нуклеозидмонофосфаты. О наиболее активном взаимодействии 5'-трифосфатов аденозина, гуанозина, уридина и цитидина с поверхностью апатита свидетельствует их способность замедлять осаждение гидроксилапатита из пересыщенного водного раствора, [430]. Соответствующие дифосфаты и монофосфаты явно выраженного влияния на кристаллизацию апатита не обнаруживают. В то же время, как нуклеозид ди-, так и трифосфаты обладают способностью ингибировать конверсию аморфного фосфата кальция (АСР) в апатит при концентрации на уровне 10^{-6} - 10^{-5} М, [431]. Если же осадок АСР, стабилизированный ингибитором, обработать гидролитическими ферментами, такими как щелочная фосфатаза, конверсия его в кристаллический гидроксилапатит протекает обычным порядком.

Сходные тенденции обнаруживаются при изучении влияния нуклеотидов на растворение апатита. В работе [432] исследовано влияние аденозинтрифосфата, аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата (соответственно, АТФ, АДФ и АМФ) на скорость растворения гидроксилапатита в воде. Наиболее эффективно растворение

апатита замедляется в присутствии АТР, АДР оказался менее эффективным, а АМР не оказывает влияния.

Эффект от добавления АТР в раствор оказался идентичен таковому для неорганического пирофосфата (PPi, см. раздел 6.3.1), известного высоким сродством к поверхности апатита. Построенная в [432] кривая зависимости скорости растворения апатита от концентрации АТР практически совпала с аналогичной кривой для PPi. Авторы видят в этом свидетельство единства механизмов взаимодействия. Они полагают, что АТР связывается с поверхностью минерала фосфатными группами, а пуриновое основание выступает в интерфейс кристалл/раствор. Интересно отметить, что подобный механизм адсорбции создаёт предпосылки для стэкинг-взаимодействия между соседними нуклеотидами.

Адсорбция мононуклеотидов апатитом в равновесных условиях была исследована в работе [309] в 1969 г. при участии Уильяма и Маргарет Нейман. Авторы принимали во внимание феномен гидратированного слоя. Была изучена адсорбция аденина, аденозина, АМР, АДР и АТР полнокристаллическим гидроксилapatитом из водных растворов содержащих 0.16 М KCl. Избыток гидроксилapatита буферировал значение pH=5.4. Выдержки в 1 час было достаточно для достижения равновесия. Примечательная особенность обсуждаемой работы в том, что изотермы адсорбции в ней построены для разных значений отношения кристалл/раствор. Сопутствующие адсорбции изменения состава раствора к сожалению изучены не были. Некоторые из результатов этой работы были впоследствии воспроизведены в [433].

Аденин и аденозин не обнаруживают какого-либо специфического взаимодействия с гидроксилapatитом. АМР проявляет тенденцию накапливаться в гидратированном слое апатита, однако его хемосорбция наблюдается лишь в области относительно высоких концентраций – от 10^{-3} М и выше, Рис. 6-47. Как можно видеть из сопоставления двух изотерм, количество адсорбированного вещества уменьшается при увеличении отношения кристалл/раствор. Авторы предположили, что обнаруженная зависимость адсорбции от отношения кристалл/раствор может быть объяснена вытеснением ортофосфат-ионов с поверхности минерала при сорбции.

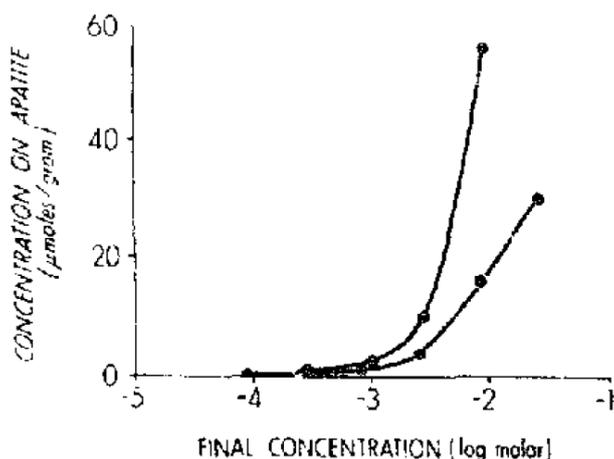


Fig. 3. The surface adsorption of AMP at high concentrations. The solid:solution ratios (g/g) were: ●, 0.1 and ■, 0.01. Note that less was adsorbed at the high solid:solution ratio.

Рис 6-47. Адсорбция АМР гидроксилapatитом для двух значений отношения кристалл/раствор.

Из работы [309]

Молекулы АДР энергично адсорбируются кристаллами апатита, при этом количество адсорбированного вещества, как и в случае АМР, уменьшается при увеличении отношения кристалл/раствор, Рис. 6-48. Обращает на себя внимание сигмоидная форма

изотерм адсорбции ADP. В современной литературе такая форма кривых интерпретируется как признак кооперативных явлений. Иначе говоря, в группе молекулы взаимодействуют с поверхностью апатита энергичнее чем по отдельности. Авторы [433], получившие сходные результаты, полагают, что источником кооперативного взаимодействия следует считать стэкинг.

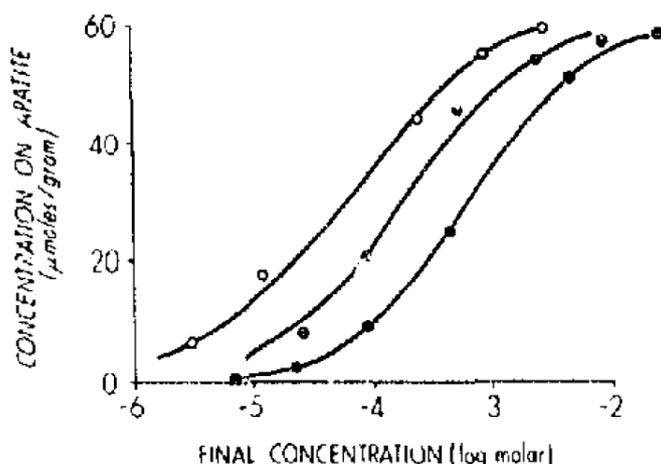


Fig. 4. The surface adsorption of ADP. The solid:solution ratios (g/g) were: ●, 0.1; ■, 0.01 and ○, 0.001. Note the apparent adsorption maximum of about 60 $\mu\text{M/g}$.

Рис 6-48. Адсорбция ADP гидроксилapatитом для трёх значений отношения кристалл/раствор.

Из работы [309]

АТФ обнаруживает более высокое сродство к гидроксилapatиту чем ADP, но в остальном изотермы адсорбции обеих молекул сходны. Для АТФ тоже имеет место сигмоидная форма кривых адсорбции, свидетельствующая о кооперативном взаимодействии, а количество адсорбированного вещества, при фиксированной концентрации АТФ в растворе, тоже уменьшается с увеличением отношения кристалл/раствор, Рис. 6-49.

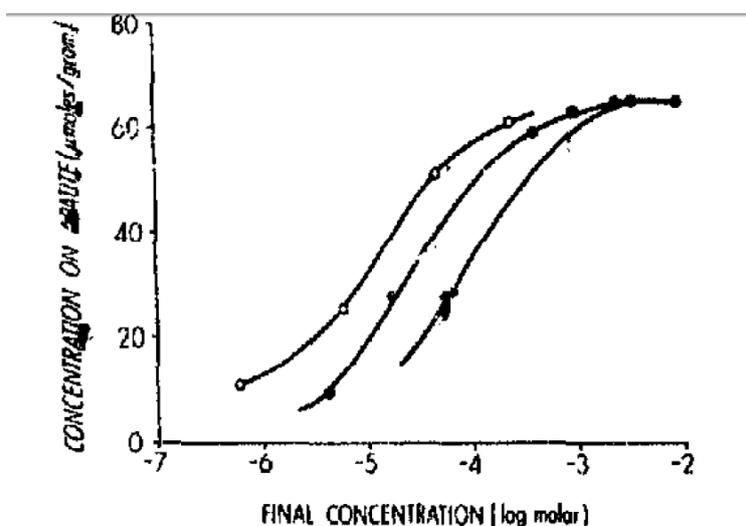


Fig. 5. The surface adsorption of ATP. The solid:solution ratios (g/g) were: ●, 0.1; ■, 0.01 and ○, 0.001. Note the apparent adsorption maximum of about 65 $\mu\text{M/g}$.

Рис 6-49. Изотермы адсорбции АТФ гидроксилapatитом для трёх значений отношения кристалл/раствор.

Из работы [305]

Авторами [305] была также исследована совместная адсорбция АТР и РРi гидроксилapatитом. Согласно их выводам, обе молекулы проявляют близкую степень сродства к поверхности апатита, и между ними имеет место конкуренция за одни и те же центры адсорбции. При этом поверхностная концентрация насыщения для РРi несколько выше, вероятно вследствие меньших размеров молекулы.

Упомянутое выше влияние отношения кристалл/раствор на адсорбцию АМР, АДР и АТР апатитом, очевидно, указывает на обмен ионами между поверхностью апатита и раствором при сорбции. Авторы предполагают, что это ортофосфат, вытесненный с поверхности кристалла фосфатными группами нуклеотидов.

Наличие обмена ионов между кристаллом и раствором при адсорбции предполагает возможность направленным образом влиять на адсорбцию, регулируя концентрации ионов в растворе. Такая возможность (для моонуклеотидов) нигде, к сожалению, систематическим образом исследована не была, однако имеется одна статья, [434], в которой изучено влияние двухвалентных катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} в растворе на адсорбцию АМР неким плохо охарактеризованным ортофосфатом кальция.

Сопоставление условий получения сорбента в [434] и в более ранней публикации тех же авторов [436] с тем, что известно об осаждении ортофосфатов кальция из водных растворов (согласно обзорам [319,285]), приводит к выводу, что, скорее всего, авторами был получен аморфный осадок АСР, который непосредственно в процессе исследования адсорбции трансформировался в кристаллический ОСР, а затем в смесь ОСР и гидроксилapatита (аббревиатура фосфатов дана как в Таблице 6-1). Хотя работа [434] не может считаться вполне надёжным источником, данные об адсорбции АМР полученным в этой работе ортофосфатом кальция при низкой концентрации Ca^{2+} в растворе близки к данным [309] об адсорбции АМР гидроксилapatитом, показанным на Рис. 100. Поэтому результаты [434], вероятно, могут быть использованы для выяснения общей тенденции.

Закономерность, выявленная в [434], сводится к следующему: при добавлении небольших (на уровне нескольких mM) количеств Ca^{2+} к раствору, сродство АМР к поверхности ортофосфата резко возрастает. Указанное влияние оказалось специфическим для иона Ca^{2+} . Добавление ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} не способствует адсорбции. Авторы цитируемой работы обнаружили ещё одну особенность влияния ионов магния и марганца на сорбцию, важную для приложений. Если к суспензии апатита, адсорбировавшего АМР (в присутствии Ca^{2+}) добавить раствор, содержащий ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} , то десорбции нуклеотида не происходит. (Важность этого факта станет ясна далее, при обсуждении путей каталитического образования фосфодиэфирных связей. Ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} могут быть использованы в качестве катализаторов, а Ca^{2+} этой реакции не катализирует.)

Адсорбция полинуклеотидов. О сродстве полинуклеотидов к апатиту можно судить лишь по результатам исследований их поведения в хроматографической колонке с апатитовым сорбентом. Детально исследованы режимы адсорбции и элюирования ДНК, плазмид, ДНК-олигомеров, РНК и антител, [437-442], позволяющие примерно оценить концентрацию NaCl или CaCl_2 , достаточную для связывания того или иного олигомера или полинуклеотида с поверхностью апатита и концентрацию фосфатного буфера необходимую для его десорбции. В руководствах по апатитовой хроматографии отмечается, что, хотя ДНК и РНК связываются с апатитом прочнее кислотных протеинов, взаимодействие далеко не столь интенсивно, как можно было бы предположить, экстраполировав на полинуклеотиды данные о взаимодействии фосфопротеинов с апатитом, учитывая число фосфатных групп на молекулу. Иными словами, фосфатные группы ДНК и РНК взаимодействуют с апатитом слабее, чем фосфатные группы фосфопротеинов.

Помимо фосфата, ДНК также может быть элюирована (переведена в раствор) с поверхности апатита раствором Na_2CO_3 , [444] и Na_2SO_4 , [443]. Установлено, что олигомеры нуклеотидов большей молекулярной массы связываются с апатитом прочнее

более мелких, что ДНК связывается с апатитом прочнее чем РНК, что двухцепочечная ДНК взаимодействует с апатитом интенсивнее одноцепочечной, а трёхцепочечная взаимодействует ещё сильнее. С повышением температуры сродство ДНК к апатиту уменьшается; во всяком случае для её элюирования требуются более низкие концентрации фосфатного буфера. Влияние температуры на элюирование ДНК детально изучено в [445]. Однако все эти данные, полученные в динамических условиях хроматографической колонки, равновесными не являются.

Стабилизация ДНК апатитом. В литературе имеются данные, косвенно свидетельствующие о некоем стабилизирующем влиянии апатита на двухцепочечную ДНК, причём в адсорбированной ДНК одновременно имеет место упрочнение как водородных связей в уотсон-криковских парах, так и фосфодиэфирных связей.

Исследования взаимодействия ДНК с апатитом для целей термической хроматографии (thermal elution chromatography) показало, что фиксирование двухцепочечной молекулы ДНК на поверхности апатита приводит к упрочнению водородных связей в уотсон-криковских парах, и вследствие этого температура денатурации ДНК повышается, [446]. Автором данной работы было обнаружено, что факторы, способствующие десорбции (элюированию) ДНК, в то же время способствуют и понижанию температуры денатурации. Например, эта температура обнаруживает линейную зависимость (в сторону уменьшения) от логарифма концентрации фосфата. Автор [446] полагает, что фиксирование двухцепочечной ДНК на поверхности апатита препятствует расплетанию ДНК, и поэтому температура денатурации повышается. Если высказанная автором [446] гипотеза верна, механическое удержание комплементарных пар нуклеотидов вместе ведёт к упрочнению водородных связей между ними.

Есть основания полагать, что стабилизирующее воздействие апатита на ДНК не ограничивается упрочнением водородных связей. Адсорбированная апатитом ДНК, вероятно, обнаруживает также и повышенную устойчивость к гидролизу. Ничем иным нельзя объяснить феноменальные успехи палеогенетики. Достаточно упомянуть недавно завершённое секвенирование ДНК предка современной лошади, небольшого травоядного, размером с собаку, с пятью пальцами на каждой ноге, обитавшего на Юконе в позднем плейстоцене, около 700 тысяч лет тому назад. Аутентичность генома сомнений не вызывает ввиду близости его к геному Лошади Пржевальского, [447].

В зубах доисторических людей, помимо ДНК человека, обнаруживается ДНК типичных микроорганизмов, обитающих в полости рта. Имеется пример извлечения ДНК возбудителя туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis* из кальцинировавшихся очагов заболевания плевры, обнаруженных в остатках человека, жившего 1400 лет назад, [448]. (Согласно недавнему исследованию [449], очаги кальцинирования слагаются биоапатитом, по составу и текстуре близким к биоапатиту костей.) Неоднократно высказывалось предположение, что успешное секвенирование ДНК из костей и зубов доисторических животных и человека, вероятно, стали возможны лишь вследствие аномально высокой устойчивости ДНК, находящейся в тесном контакте с биоапатитом.

В работе [450], для проверки гипотезы о роли апатита в сохранении древней ДНК, исследовали ДНК как из древних костей и зубов, так и из современных, искусственно изменённых. Обнаружено, что степень сохранности ДНК уменьшается пропорционально степени изменения апатита, в согласии с высказанной гипотезой.

Недавно гипотеза о стабилизирующем воздействии апатита на адсорбированную ДНК была проверена экспериментально в работе [451]. Авторы в течение 90 минут выдерживали гранулы керамического гидроксилатапата в водном растворе ДНК, извлечённой из *Fusobacterium nucleatum*, затем гранулы выдерживались на протяжении трёх месяцев в различных средах, таких как вода, сыворотка, раствор дезоксирибонуклеазы I. В контрольных опытах ДНК выдерживалась в аналогичных средах без апатита. Через определённые промежутки времени сохранившаяся ДНК

извлекалась из зёрен апатита при помощи ЭДТА и анализировалась электрофоретически. Через три месяца ДНК всё еще обнаруживалась в апатите выдержанном в перечисленных трёх средах, а в контрольных опытах её концентрация была ниже уровня определения. Тем самым была подтверждена повышенная стабильность ДНК, адсорбированной апатитом, и её устойчивость к действию нуклеаз сыворотки и к дезоксорибонуклеазе I.

Собирая вместе разрозненные факты, мы видим косвенные свидетельства того, что с одной стороны адсорбция нуклеиновых кислот не препятствует стэкингу, как видно из сигмоидной формы изотерм адсорбции, Рис 6-48, 6-49, а с другой, адсорбция способствует стабилизации водородных связей в уотсон-криковских парах и даже фосфодиэфирных связей, соединяющих нуклеотиды в цепочки. Создаётся впечатление, что адсорбция апатитом ведёт к усилению всех трёх основных взаимодействий, удерживающих двухцепочечные полинуклеотиды в виде единой молекулы.

Захват молекул ДНК растущими кристаллами апатита. Подобно другим молекулам с кислотными группами, адсорбированная ДНК может быть захвачена растущим кристаллом апатита. На этом основан метод кальций-фосфатной трансфекции, предложенной авторами [452] в 70-х годах XX века. Трансфекцией называют процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки человека и животных невирусным методом, широко используемый при исследованиях экспрессии генов. Суспензию нанокристаллов апатита, содержащих ДНК или РНК, добавляют к культуре клеток. Апатитовые частицы проникают внутрь клеток. Затем, при участии лизосом, апатит растворяется, высвобождая полинуклеотид.

Приготовить апатитовые кристаллы с примесью ДНК несложно: раствор, содержащий буфер HEPES, фосфат и ДНК, смешивают с хлористым кальцием. При этом образуются содержащие ДНК частицы гидроксилапатита нанометровых размеров. Однако частицы апатита получаются исключительно мелкими, потому что присутствующая в растворе ДНК препятствует их разрастанию. Размеры кристаллов могут быть несколько увеличены добавлением избыточного CaCl_2 в раствор, при этом количество захваченной кристаллом ДНК многократно возрастает. Весьма вероятно, что обрастание адсорбированной ДНК апатитом имеет место вследствие ярко-выраженной способности ДНК катализировать нуклеацию кристаллов апатита, детально исследованной в недавней работе [453].

Совместное осаждение фосфата кальция и ДНК из пересыщенных растворов детально исследовалось в [454] для установления оптимальных условий трансфекции. Согласно этим данным, соосаждение имеет место лишь в очень узком диапазоне физико-химических параметров, прежде всего концентраций кальция и фосфата. Практически вся содержащаяся в растворе ДНК может быть связана в нерастворимый комплекс с фосфатом кальция меньше чем за минуту. Однако природа образующихся при этом частиц исследована не была.

Для трансфекции могут быть использованы как кристаллы гидроксилапатита, так и карбонатапатита. Количество поглощённой кристаллами ДНК можно существенно увеличить, если использовать специальным образом приготовленные кристаллы. Например, в работе [455] представлен метод изготовления апатитовых наностержней из гидроксилапатита, высокой степени кристалличности. Наностержни обнаруживают способность адсорбировать и захватывать значительно большие количества ДНК. Адсорбционная ёмкость становится исключительно высокой при наличии небольшого избытка CaCl_2 (0.2 mol/L). В работе [456] для целей трансфекции были изготовлены многослойные наноструктуры, состоящие из апатитового ядра, окруженного оболочкой из адсорбированной ДНК, сверху покрытой ещё одним слоем апатита.

Детальное исследование кристаллов гидроксилапатита, содержащих до нескольких процентов ДНК, было выполнено в работе [457]. Авторы сумели вырастить сравнительно крупные кристаллы гидроксилапатита (микронных размеров, Рис. 6-50) из растворов, содержащих от 0 до 1 g/L ДНК, поддерживая низкую степень пересыщения и повысив

температуру синтеза до 80° С. Кристаллы характерного игольчатого габитуса; размеры их, в особенности толщина, уменьшаются с увеличением содержания ДНК.

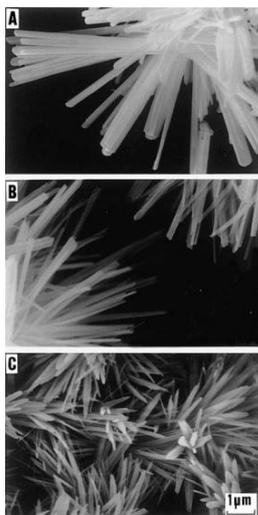


Рис 6-50. Кристаллы гидроксилапатита выращенные из раствора (А) не содержащего ДНК, (В) содержащего 0.1 g/l ДНК и (С) содержащего 1 g/l ДНК. Изображения в сканирующем электронном микроскопе. Из работы [457].

Присутствие ДНК в полученных кристаллах подтверждено с помощью т.н. *CHN microanalysis*. (В методике, известной как *CHN microanalysis*, образцы нагревают до 900° С в токе кислорода высокой чистоты, затем продукты сгорания анализируются газовым хроматографом.) Согласно данным авторов (Таблица 6-4), полученные кристаллы содержат до 4% ДНК. Присутствие ДНК в кристалле было также подтверждено методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (ЕССА) и Фурье ИК-спектроскопии (FTIR). Авторы отмечают, что в высоком разрешении пик Са 2р для содержащего максимальное количество ДНК образца $\text{HAp}_{\text{DNA}1.0}$ несколько уширен по сравнению с контрольным образцом HAp , вероятно, вследствие взаимодействия фосфатных групп ДНК с ионами Ca^{2+} апатита.

Таблица 6-4. Концентрации водорода, углерода и азота в содержащих ДНК кристаллах гидроксилапатита.

	H (%)	C (%)	N (%)
HAp	0.57	0.00	0.00
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.1}$	0.70	0.75	0.36
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.2}$	0.76	1.20	0.50
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.5}$	0.81	1.70	0.60
$\text{HAp}_{\text{DNA}1.0}$	0.90	2.07	0.83

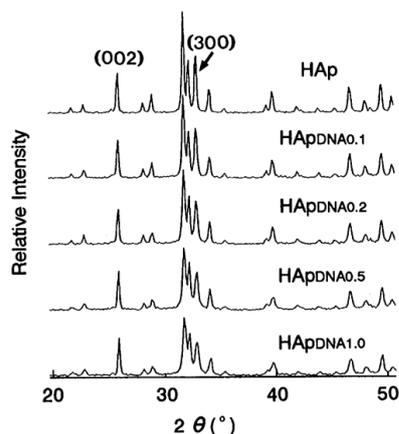


Рис 6-51. Рентгеновские дифрактограммы содержащих ДНК кристаллов гидроксилапатита. Из работы [457].

Рентгенограммы полученных кристаллов соответствуют гидроксилапатиту. Наблюдается значительное уширение дифракционных пиков, свидетельствующее о высокой дефектности кристаллов. Причём уширение становится более выраженным по мере увеличения концентрации ДНК в исходном растворе, Рис. 6-61.

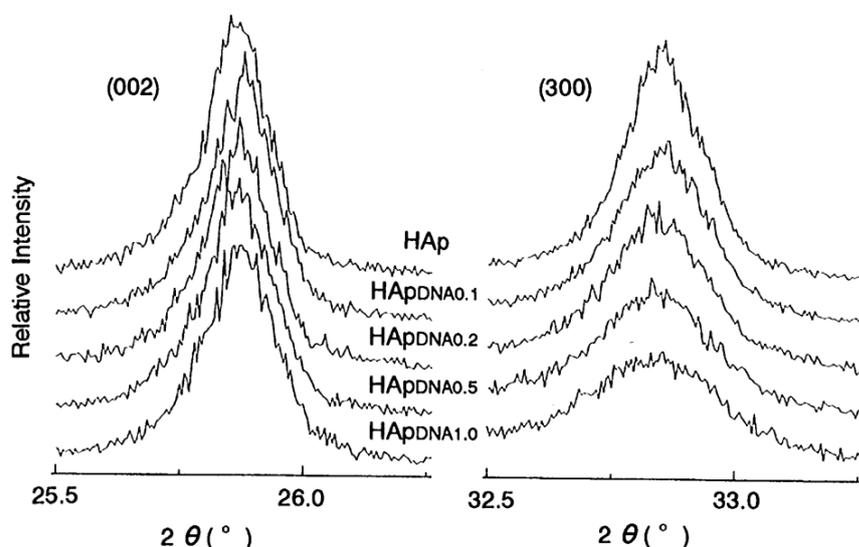


Рис 6-52. Отражения (002) и (300) рентгенограммы содержащего ДНК гидроксилапатита в более высоком разрешении. Из работы [457].

Исследовав пики отражений (002) и (300) в более высоком разрешении, Рис. 6-52, авторы пришли к заключению, что, несмотря на значительное уширение пиков, вхождение ДНК в кристалл не приводит к смещению максимумов интенсивности. Это, в свою очередь, означает, что параметры a и c решётки апатита не изменяются при вхождении ДНК в кристалл. Отсюда делается вывод, что ДНК не внедряется в кристалл, а лишь взаимодействует с его поверхностью. Сразу отметим, последний вывод авторов нельзя считать достаточно обоснованным. Согласно приводимым авторами анализам, Таблица 6-4, содержание ДНК в кристаллах изменяется от нуля до нескольких процентов. Но, с одной стороны, площадь поверхности кристаллов микронных размеров, подобных показанным на Рис. 6-50, недостаточна для размещения таких количеств ДНК. С другой стороны, изоморфное вхождение нескольких процентов примеси обычно сопровождается лишь незначительным изменением параметров кристаллической решётки. При том

качестве дифрактограмм, которое мы видим на Рис. 6-52, об обнаружении столь малых смещений не представляется возможным.

Исследование спектров ЯМР на ядрах ^{31}P показало наличие двух резонансов в апатите содержащем ДНК, Рис. 6-53. Первый пик совпадает с пиком, соответствующим PO_4^{3-} гидроксилapatита, а второй, более слабый, близок к пику свободной ДНК, но не совпадает с ним. Наличие небольшого положительного химического сдвига (по отношению к спектру свободной ДНК, полагают авторы, говорит о наличии химического взаимодействия между фосфатными группами ДНК и апатитом.

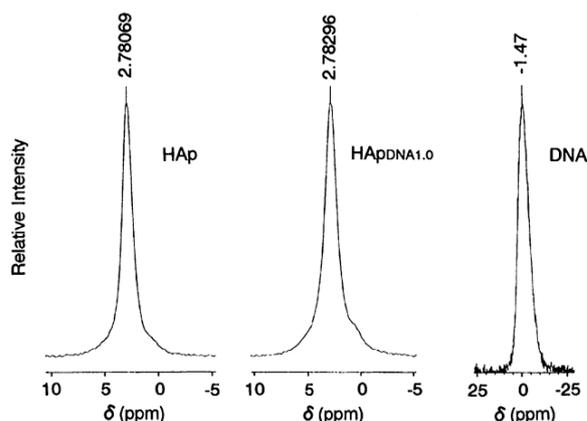


Рис 6-53. Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P гидроксилapatита (HAp), гидроксилapatита содержащего ДНК ($\text{HAp}_{\text{DNA}1.0}$) и свободной ДНК (DNA). *Из работы [457].*

Ещё одна важная особенность кристаллов гидроксилapatита с ДНК – их повышенная растворимость в воде. По мере увеличения количества ДНК, заключённой в апатит, в растворе одновременно повышаются содержания кальция и фосфата, Таблица 6-5.

Таблица 6-5. Концентрация кальция и фосфата в водном растворе, содержащем кристаллы гидроксилapatита с ДНК. *Из работы [457].*

Apparent solubility of HAp synthesized in the presence of deoxyribonucleic acid, DNA

	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)
HAp	31.1 ± 1.1	16.9 ± 0.4
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.1}$	31.6 ± 0.5	17.8 ± 0.1
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.2}$	31.2 ± 0.3	17.9 ± 0.3
$\text{HAp}_{\text{DNA}0.5}$	32.6 ± 0.3	18.4 ± 0.2
$\text{HAp}_{\text{DNA}1.0}$	33.3 ± 0.2	19.2 ± 0.3

Обсуждая вероятный механизм образования смешанных кристаллов, авторы [457] отмечают, что данные ESCA и ЯМР свидетельствуют об образовании ионных связей между положительно заряженными ионами Ca^{2+} апатита и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Взаимодействие, считают авторы, ограничено поверхностью кристаллов, поскольку захват ДНК кристаллом не сопровождается заметным изменением параметров решётки. На мой взгляд, данные авторов вполне согласуются с предположением о встраивании части ДНК в кристаллическую решётку апатита.

О возможности встраивания двухцепочечной спирали ДНК в структуру апатита неоднократно писал Эдуард Костецкий [458,120], развивший собственную теорию возникновения жизни, согласно которой первоначальная ДНК возникла внутри природного кристалла апатита. Исходя из геометрических соображений, данный автор

предложил способ встраивания молекулы Z-ДНК в кристаллическую решётку апатита, так что ось спирали совпадает с винтовой осью шестого порядка решётки, фосфатные группы ДНК располагаются в позициях тетраэдров PO_4 , а расстояния между азотистыми основаниями оказываются близким к половине параметра c решётки.

Возможность встраивания двойной спирали ДНК в структуру гидроксилapatита и фторапатита была недавно теоретически изучена методами молекулярной динамики в работе [121]. Предложенный Костецким механизм, согласно расчётам авторов [121], неосуществим, поскольку приводит к серьёзным искажениям связей. Тем не менее, развивая идеи Костецкого, авторы нашли возможность размещения В-ДНК в гидроксилapatите, не приводящую к существенным искажениям связей. Для фторапатита, впрочем, этот способ размещения В-ДНК оказался неприменим, потому что возникающая в этом случае дисторсия связей приводит к разрушению молекулы.

Расчёты авторов [121] показывают, что встраивание двойной спирали ДНК в структуру гидроксилapatита возможно, но в строго определённой ориентации. Вопрос о том, является ли реально наблюдаемый захват ДНК растущим кристаллом апатита встраиванием или механическим захватом, остаётся открытым. Тем не менее, трудно себе представить механизм захвата макромолекулы растущим кристаллом апатита, обеспечивающий правильную ориентацию макромолекулы на всём её протяжении. На мой взгляд, обсуждённые выше экспериментальные данные о содержащих ДНК кристаллах апатита лучше всего объясняются в предположении, что встраивание спиральной ДНК в решётку минерала имеет место на отдельных участках молекулы. Встраивание фосфатных групп ДНК в позиции тетраэдров PO_4 апатита на таких участках приводит к образованию ионных связей между фосфатами ДНК и кальцием апатита, что и проявляется в спектрах ЯМР и ESCA. На других участках, вероятно, имеет место механический захват молекулы.

6.3.9. Обсуждение. Механизм адсорбции апатитом молекул с кислотными группами.

Различные соединения с кислотными группами – фосфатными, фосфонатными и карбоксильными, зачастую помимо названных функциональных групп ничего общего между собой не имеющие, во взаимодействии с апатитом обнаруживают разительные черты сходства, свидетельствующие о единстве механизма адсорбции. Наша задача состоит в идентификации этого механизма и выяснении, может ли он быть задействован в процессах полимеризации нуклеотидов путем стемпинга апатитовой основы.

Экспериментальные исследования адсорбции молекул с кислотными группами апатитом, детально обсуждённые выше, обнаруживают ряд общих закономерностей, независимо от особенностей химизма и структуры молекул. (Начиная с этого места, ссылки даются только на работы, ранее в этой главе не обсуждавшиеся.)

- (1) Энтропия является либо единственной, либо главенствующей движущей силой процесса адсорбции (пирофосфат, пироксидифосфат, бисфосфонаты: алендронат, памидронат, золедронат, дезоксизоледронат, ризедронат, дезоксиризедронат, орторизедронат, десазапризедронат, этидронат и хлодронат, макроциклы с фосфонатными группами: DOTP и DPPED, полиакриловая кислота, протеины: стацерин, PRP1, PRP3, полиаспарагиновая кислота и бычий сывороточный альбумин).
- (2) При связывании молекулы с поверхностью апатита концентрация ортофосфата в растворе возрастает (пирофосфат, полиакриловая кислота, бисфосфонаты: хлодронат, этидронат, золедронат, алендронат, памидронат, ризедронат, дезоксиризедронат, орто-ризедронат и тилудронат. С другой стороны, повышение концентрации ортофосфата в растворе способствует десорбции (кислотные белки, ДНК, РНК, бисфосфонаты: золедронат, ризедронат, дезоксиризедронат и орторизедронат, соединение NE10790, являющееся фосфонокарбоксилатным аналогом ризедроната).

- (3) При связывании молекулы с поверхностью концентрация кальция в растворе уменьшается (пирофосфат, полиакриловая кислота, амелогенин, бисфосфонаты: хлоронат и этидронат), а повышение концентрации кальция в растворе способствует адсорбции (протеины слюны, бычий сывороточный альбумин, аденозинмонофосфат, ДНК, РНК).
- (4) В отсутствие кальция в растворе, молекулы, имеющие только одну кислотную группу, не сорбируются апатитом, требуется как минимум две такие группы на каждую молекулу (пирофосфат, пироксидифосфат, бисфосфонаты, цитрат, фосфоцитрат); сродство полианионов к апатиту увеличивается пропорционально размеру молекулы (линейные неорганические полифосфаты, [323], полиалкеновые кислоты, РНК, ДНК).
- (5) Молекулы сорбируются не на отдельных дефектах кристалла, а по всей доступной поверхности грани, так что поверхностная концентрация насыщения равна одной-двум молекулам на каждую элементарную ячейку кристалла, выходящую на грань (памидронат, цитрат, стацерин); при адсорбции сходных молекул имеет место обратная корреляция между поверхностной концентрацией насыщения и размером молекулы (пирофосфат > этидронат > хлоронат; пирофосфат > аденозинтрифосфат; аминокислоты с одной карбоксильной группой: лейцин < валин < аланин < глицин).
- (6) В качестве сорбирующей выступает грань гексагональной призмы (цитрат, амелогенин, остеокальцин); ось удлинения молекулы (проходящая через центральные атомы (С или Р) соседних кислотных групп, параллельна оси z кристалла (пирофосфат, цитрат, бисфосфонаты). Захват адсорбированных молекул растущим кристаллом апатита приводит к удлинению кристалла и нарушению его когерентности, свидетельствующих об ориентации оси удлинения адсорбированных молекул вдоль оси z кристалла (полиакриловая кислота, полиаспарагиновая кислота).
- (7) Имеет место определённая взаимозаменяемость между кислотными группами, так что при замене одной группы на другую сродство к апатиту не утрачивается. При замене одной фосфатной или фосфонатной группы на карбоксильную, сродство молекулы к апатиту снижается, но не столь существенно (пирофосфат–фосфоцитрат, фосфоцитрат–цитрат, ризедронат–соединение NE10790, замена фосфосерина на аспарагин во фрагменте SN-15 стацерина). При совместной адсорбции двух соединений имеет место конкуренция между ними за одни и те же центры адсорбции (пироксидифосфат–фосфат, пирофосфат–этидронат, цитрат–пирофосфат, цитрат–метилен-дифосфоновая кислота, цитрат–этидронат, цитрат–аледронат, пирофосфат–аминокислоты, пирофосфат–бычий сывороточный альбумин).
- (8) Протонирование кислотной группы молекулы препятствует адсорбции (полиакриловая кислота), а протонирование её боковых цепей способствует адсорбции (ризедронат, стацерин). Если степень протонирования молекулы в диапазоне устойчивости апатита не меняется, то и вариации рН на её адсорбцию существенного влияния не оказывают (пирофосфат, золедронат).
- (9) Кристаллизация апатита из раствора, содержащего адсорбат, приводит к образованию смешанных кристаллов (цитрат, полиакриловая кислота, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, полиаспарагиновая кислота, бычий сывороточный альбумин, ДНК). Такие кристаллы отличаются более высокой растворимостью в воде, чем беспримесный апатит.

Сходство в поведении сорбируемых молекул свидетельствует о единстве механизма их хемосорбции апатитом. Ввиду единства механизма, особенности адсорбции отдельных более детально изученных представителей, очевидно, характеризуют весь класс

соединений с кислотными группами, как целое. Прежде всего, это позволяет отвести как несостоятельные представления о хелатной природе адсорбции.

Имеется ряд соединений, для которых несостоятельность представлений о ведущей роли хелатных комплексов в адсорбции их апатитом вполне очевидна: фосфоцитрат, обнаруживающий необычайно высокое сродство к апатиту, оказался слабым хелатообразователем. С другой стороны, известная устойчивостью хелатных комплексов с кальцием фитиновая кислота, Рис. 6-54, отличается пониженным (в сравнении с другими полифосфатами) сродством к апатиту, [323]. Далее, в работе [366] на примере олигомеров акриловой кислоты и некоторых других карбоновых кислот показано отсутствие корреляции между их сродством к поверхности гидроксилapatита и константами устойчивости соответствующих кальциевых хелатов. Всё это, очевидно, противоречит гипотезе о хелатной природе сродства молекул с кислотными группами к апатиту.

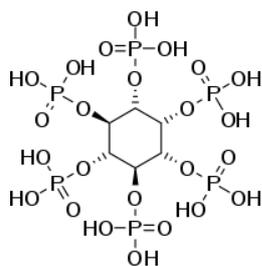


Рис 6-54. Фитиновая кислота.

Ещё один аргумент против хелатной теории усматривается в более современных разработках по апатитовой хроматографии. В ставших классическими работах Марины Горбунофф [280-282], сыгравших решающую роль в широком распространении представлений о хелатообразовании при сорбции, были исследованы возможности элюирования адсорбированных апатитом протеинов различными анионами. Однако возможность элюирования сульфатами Горбунофф не изучала, полагая это лишённым смысла, поскольку сульфаты не образуют комплексов с кальцием. Сила убеждения в правоте представлений Горбунофф была столь велика, что впервые возможность использования Na_2SO_4 в качестве элюэнта была исследована только в 2008 г. в работе [443]. В результате обнаружилось, что кислотные протеины и ДНК вполне успешно смываются с апатита сульфатом, в явном противоречии с теорией хелатообразования.

Хелатообразованием при сорбции трудно также объяснить тот факт, что замена кальциевого гидроксилapatита на стронциевый, или же частичная замена иона Ca^{2+} в гидроксилapatите на Sr^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , La^{3+} , Ti^{4+} и ряд других катионов не сказывается существенным образом на адсорбции бычьего сывороточного альбумина. (В большинстве случаев сродство протеина к апатиту возрастает.) Сходным образом, согласно данным [205], модифицирование кальциевого гидроксилapatита ионом Cu^{2+} не влияет на адсорбцию бензойной кислоты.

Сказанного, я полагаю, достаточно для окончательного развенчания представлений о хелатном механизме взаимодействия молекул с апатитом.

Подобно тому, как замены в катионной подрешётке апатита не влияют существенным образом на сорбцию, замены в подрешётке т.н. «малого» аниона тоже не приводят к утрате сорбционной активности. Частичное замещение группы $(\text{OH})^-$ гидроксилapatита на карбонат или фторид не оказывают заметного влияния. То же наблюдается и при полном замещении гидроксила на фторид, т.е. при переходе от гидроксилapatита к фторапатиту. В самом деле, в современной апатитовой хроматографии используются два типа сорбента – гидроксилapatитовый и фторапатитовый, используемые для сорбции одних и тех же соединений. Тем самым, «малый» анион непосредственного участия в связывании тоже не принимает. Ввиду неучастия катиона и «малого» аниона в связывании, сорбируемая молекула должна взаимодействовать с фосфатом, поскольку других компонентов в

апатите нет. Взаимодействие кислотной группы сорбируемой молекулы с фосфат-анионом кристалла не может быть электростатическим притяжением, поскольку обе заряжены отрицательно. Единственная остающаяся возможность состоит в встраивании кислотных групп сорбируемых молекул в позиции ортофосфатов гидратированного слоя апатита.

В литературе имеется большое количество оценок заряда поверхности апатита, основанных на замерах электрофоретической подвижности его кристаллов в водной суспензии. Заряд поверхности сложным образом меняется в зависимости от состава и ионной силы раствора, температуры, pH и метода приготовления апатита, тем не менее, поверхность всегда несёт отрицательный заряд при не слишком низких значениях pH. В работе [459], посвящённой адсорбции фермента каталазы гидроксилapatитом, был измерен заряд как сорбирующей поверхности, так и сорбируемого протеина. Оба – адсорбент и адсорбат, как оказалось, заряжены отрицательно во всех исследованных растворах, а после адсорбции поверхность остаётся отрицательно заряженной, но заряд увеличивается по абсолютной величине. При этом механизм адсорбции тот же, что и у других соединений, обсуждаемых в данной главе, судя по тому, что адсорбция каталазы сопровождается выделением ортофосфат-ионов в раствор, а количество адсорбированного вещества увеличивается при уменьшении концентрации ортофосфата и увеличении концентрации кальция. Тем самым электростатическое взаимодействие сорбируемой частицы с поверхностью кристалла никак не может быть движущей силой адсорбции (если речь идёт о молекулах с кислотными группами, заряженными отрицательно).

Феномен адсорбции отрицательно заряженной гранью отрицательно заряженных частиц может быть объяснён как замещение одних отрицательно заряженных частиц (ортофосфат-ионов на поверхности кристалла) другими (кислотными группами молекулы). Обнаруженное в [459] увеличение отрицательного заряда поверхности в результате адсорбции, вероятно, есть следствие изменения степени протонирования фосфатов. В самом деле, ортофосфаты гидратированного слоя (как указывалось в разделе 6.2) характеризуются высокой степенью протонирования, а низкая степень протонирования кислотных групп сорбируемых молекул составляет одно из условий адсорбции (см. пункт(8) выше).

Кислотные группы молекулы, встроенные в позиции ортофосфатов, располагаясь на отрицательно заряженной поверхности кристалла, должны образовывать ионные связи с положительно заряженными ионами (Ca^{2+} в случае кальциевого апатита), расположенными под этой поверхностью. Образование таких связей действительно было продемонстрировано спектроскопическими методами для полиалкеновых кислот адсорбированных гидроксилapatитом и биоapatитом, и для кристаллов гидроксилapatита с примесью ДНК.

Имеющиеся данные спектроскопии также согласуются с представлением о встраивании кислотных групп в позиции тетраэдров PO_4 апатита при адсорбции. Так, вследствие связывания с поверхностью, фосфонатные группы бисфосфонатов при адсорбции утрачивают способность к вращению, о чём можно судить по их ЯМР-спектрам на ядрах ^{31}P . Далее, расстояние от атома углерода группы COO^{2-} адсорбированного цитрата до ближайших к ней атомов фосфора в апатите, по данным спектроскопии ЯМР, равно 0.3-0.45 nm. Сходным образом, расстояние между $^{13}\text{C}_\delta$ карбоксильной группы остатка E5 адсорбированного гидроксилapatитом стазераина и ближайшим атомом фосфора оценивается в 0.425 nm. Эти значения близки к типичным значениям расстояний между двумя атомами P в апатите.

При встраивании в позицию PO_4 на поверхности кристалла, кислотная группа сорбируемой молекулы получает возможность взаимодействовать сразу с несколькими катионами, расположенными ниже (не менее трёх). При этом двухзарядные фосфатные группы пирофосфата и протеинов, а также и фосфонатные группы должны взаимодействовать интенсивнее карбоксильных, являющихся однозарядными. Ровно это и

наблюдается при замене фосфосерина на остаток аспарагиновой кислоты во фрагменте SN-15 стазераина, при переходе от пирофосфата к фосфоцитрату, от фосфоцитрата к цитрату, от ризедроната к соединению NE10790. Этим же может быть объяснён известный из практики апатитовой хроматографии факт, что (двухзарядные) фосфатные группы фосфопротеинов взаимодействуют с апатитом интенсивнее (однозарядных) фосфатных групп ДНК и РНК (полинуклеотиды связывается с апатитом прочнее фосфопротеинов лишь потому, что многократно превосходят их числом фосфатных групп).

Образование ионных связей между кислотными группами сорбируемых молекул и катионами апатита в процессе адсорбции происходит параллельно с разрывом подобных связей вытесняемого в раствор ортофосфата. Сила связи, поэтому, оказывается важным, но не решающим фактором, определяющим, будет ли иметь место адсорбция. Поэтому главной движущей силой процесса адсорбции (во всяком случае ранней его стадии) должен быть энтропийный эффект от выделения фосфат-ионов в раствор, тогда как энтальпийный эффект адсорбции, отслеживающий изменения в структуре связей, должен иметь подчинённое значение по сравнению с энтропийным. Главенствующее значение энтропийного эффекта адсорбции над энтальпийным действительно фиксируется при термодинамическом исследовании адсорбции методом калориметрического титрования (бисфосфонаты, стазерин).

Поскольку для положительности энтропийного эффекта адсорбции число высвобождаемых частиц должно превосходить число фиксируемых, адсорбция (при низких концентрациях кальция) не имеет места для молекул с единственной кислотной группой (нуклеозидмонофосфаты, монофосфонаты). Для молекул с двумя кислотными группами, ввиду необходимости встраивания обеих групп в позиции тетраэдров PO_4 , адсорбция осуществима лишь при наличии жёсткого геометрического соответствия между расположением тетраэдров PO_4 в апатите и кислотных групп в молекуле (пирофосфат, фосфоцитрат, цитрат, бисфосфонаты). В первом приближении, энтропийный эффект от вытеснения фосфатов в раствор пропорционален числу вытесняемых фосфатов на одну сорбируемую молекулу, которое, в свою очередь, пропорционально числу встраиваемых кислотных групп сорбируемой молекулы. Поэтому для молекул, имеющих несколько кислотных групп, сродство к апатиту должно возрастать пропорционально числу кислотных групп. Ровно это и наблюдается: сродство олигомеров ДНК, РНК и алкеновых кислот к апатиту возрастает пропорционально длине молекулы.

Из вышеизложенного следует, что на ранней стадии адсорбции депротонированные кислотные группы сорбируемых молекул вытесняют в раствор протонированные фосфат-анионы гидратированного слоя апатита, занимая их позиции в структуре гидратированного слоя, покрывающего кристалл. Переходя к обсуждению следующей стадии, напомним, что, согласно выводам, полученным в разделе 6.2, суспензии нанокристаллического апатита, используемые при исследовании адсорбции, представляют собой тонкие чешуйки, покрытые гидратированным слоем. Слой этот аналогичен гидратированному слою в кристаллической структуре ОСР, сопрягается с гранью призмы $(10\bar{1}0)$ апатита. Поскольку участие гидратированного слоя в адсорбции доказано в случае пирофосфата, разумно предположить, что адсорбция всех молекул с кислотными группами должна протекать с участием этого слоя. Последнее означает, что сорбирующей гранью апатита должна быть грань $(10\bar{1}0)$ или сходная с ней. В этой связи представляется примечательным, что во всех известных случаях сорбирующая грань апатита ориентирована параллельно оси z кристалла (см. пункт (б) выше), т.е. это грань гексагональной призмы. (Грань $(10\bar{1}0)$ тоже является гранью призмы).

С химической точки зрения, гидратированный слой отличается от апатита сразу в трёх отношениях: в нём присутствуют молекулы структурной воды, отсутствующие в апатите, его фосфат-анионы протонированы (а в апатите они депротонированы), наконец, в нём содержится меньше кальция (в гидратированном слое $Ca/P = 1.52$, а для апатита $Ca/P =$

1.67). Представляется разумным предположить, что встраивание депротонированных кислотных групп сорбируемых молекул в гидратированный слой апатита приводит к фазовому превращению в слое. Скорее всего, он (локально) превращается в апатит. Этим объясняется тот факт, что адсорбция сопровождается переносом кальция из раствора в гидратированный слой. Молекулы воды при этом покидают слой, и энтропийный эффект, происходящий от увеличения числа подвижных частиц, вероятно, является движущей силой процесса. Структурное преобразование гидратированного слоя развивается постепенно, поэтому оно не фиксируется в экспериментах по калориметрическому титрованию, которые длятся лишь несколько минут. Тот факт, что в экспериментах с пирофосфатом кальций гидратированного слоя утрачивает подвижность через два дня после адсорбции, тоже получает объяснение – в отсутствие воды диффузия кальция в апатите на многие порядки медленнее диффузии его в гидратированном слое.

Далее, поскольку содержание кальция в апатите выше, чем в гидратированном слое, повышение концентрации кальция в растворе, согласно принципу Ле Шателье, должно способствовать превращению гидратированного слоя в апатит. Этим можно объяснить тот факт, что молекулы с одной кислотной группой, такие как нуклеозидмонофосфаты, при физиологических условиях апатитом не сорбируются, однако адсорбция имеет место при повышенной концентрации кальция в растворе.

В изложенной здесь двухстадийной модели адсорбции предполагается, что движущей силой процесса на обеих стадиях является энтропийный эффект, происходящий от увеличения числа подвижных частиц в системе – сначала от высвобождения фосфатов в раствор, а затем молекул воды. Тем самым, результирующей движущей силой процесса адсорбции в целом должна быть энтропия. В нашем распоряжении имеются оценки термодинамических параметров адсорбции для десяти соединений, основанные на изотермах адсорбции, характеризующие процесс в целом. Во всех десяти энтропия действительно оказалась либо главенствующей, либо единственной движущей силой процесса адсорбции.

Подводя итог, механизм хемосорбции молекул с кислотными группами апатитом совпадает с гипотетической хемосорбцией поли- и мононуклеотидов, фигурирующей в процессах стемпинга (в ходе которой нуклеиновые кислоты помещают свои фосфатные группы в позиции тетраэдров PO_4 на поверхности одной из граней кристалла апатита). Именно этот процесс лежит в основе апатитовой хроматографии. Своим возникновением хемосорбция обязана свойствам гидратированного слоя на поверхности некоторых граней апатитовых кристаллов, вероятно, составляющем явление уникальное.

Закономерности, выявленные при исследовании сорбции молекул с кислотными группами, могут быть использованы для регулирования тех стадий процесса стемпинга, на которых имеет место укоренение моно- или полинуклеотидов в основе или их элюирование. В частности, процесс адсорбции обратим. Его протекание может регулироваться составом раствора. Повышение концентрации Ca^{2+} способствует адсорбции, а повышение концентрации ортофосфата приводит к десорбции. Сродство полинуклеотидов к поверхности минерала усиливается при увеличении длины цепи. Мононуклеотиды и небольшие олигомеры могут быть адсорбированы только при повышенных концентрациях Ca^{2+} в растворе.

Помимо фосфата, для десорбции (элюирования) нуклеотидов с апатита могут быть использованы пирофосфат, сульфат и карбонат. В качестве компонентов, способствующих адсорбции (наряду с $CaCl_2$) могут быть использованы $BaCl_2$ и $AlCl_3$. Не все многозарядные катионы способствуют адсорбции. После обработки растворами $MgCl_2$ и $MnCl_2$ апатит не адсорбирует нуклеиновых кислот (вероятно, вследствие изменений в структуре гидратированного слоя). Однако, если растворы этих солей добавить к суспензии апатита, адсорбировавшего нуклеотиды, то десорбции не происходит. Последним обстоятельством можно воспользоваться для каталитического образования фосфодиэфирной связи, см. ниже, раздел 9.2.2.

Изменение температуры, в целом, не оказывает значительного влияния на сродство адсорбированных молекул к апатиту.

Обзор имеющихся данных также приводит к выводу, что замещения в катионной подрешётке апатита, и в его подрешётке «малого» аниона существенного влияния на сорбционную активность не оказывают. Так, при частичной замене гидроксильной группы (ОН)⁻ апатита на (СО₃)⁻ и даже при полной замене его на F⁻, минерал не утрачивает способности адсорбировать нуклеиновые кислоты. По аналогии можно предположить, что замена гидроксила на хлорид или бромид-ион также не должна сказываться существенным образом на способности апатита адсорбировать нуклеотиды. Исследованные замены в катионной подрешётке, такие как полная замена Ca²⁺ на Sr²⁺, частичная (до 10%) на Zn²⁺ сопровождаются увеличением адсорбционной активности. При замене до 10% Ca²⁺ в апатите на Fe³⁺ количество адсорбированного вещества увеличивается в 2.7 раз, а при замещении на La³⁺ уменьшается в несколько раз. Увеличением адсорбционной активности сопровождаются замены (до нескольких процентов) Ca²⁺ на Ti⁴⁺ или Al³⁺. (Причины, вследствие которых модифицирование состава апатита, используемого в качестве основы, может оказаться целесообразным, разъясняются в главах 7 и 9.)

6.4. Некоторые особенности хемосорбции, важные при проведении стемпинга.

Вывод, что механизм хемосорбции нуклеотидов и полинуклеотидов апатитом совпадает с механизмом, постулируемом в гипотетических процессах стемпинга, сделанный в предыдущем разделе, при всём его значении, недостаточен для разъяснения всех вопросов, возникающих при планировании экспериментального воспроизведения процессов стемпинга. Помимо механизма связывания нуклеиновых кислот с апатитом, при стемпинге большое значение имеет взаимное расположение сорбируемых нуклеотидов. На этом базируется наш принцип геометрического соответствия (равенство определённых длин связи в полинуклеотиде соответствующим межатомным расстояниям в кристалле, см главу 4). В этой связи принципиальное значение приобретает вопрос о наличии (двумерного) кристаллического дальнего порядка в гидратированном слое апатита, разъяемый в разделе 6.4.1. Кроме того, для практического осуществления реакций копирования полинуклеотидов необходимо найти способы осуществить хемосорбцию матрицы (одноцепочечного полинуклеотида), при которых адсорбированная молекула вытянута вдоль некоторого кристаллографического направления. Этот вопрос решается в разделе 6.4.2.

6.4.1. Наличие кристаллического дальнего порядка в гидратированном слое.

При стемпинге, фосфатные группы сорбируемых нуклеотидов встраиваются в позиции тетраэдров PO₄ кристалла, в результате чего пространственное расположение нуклеотидов на сорбирующей грани приобретает закономерный характер. Последнее составляет одно из необходимых условий соблюдения принципа комплементарности в синтезируемых двухцепочечных полинуклеотидах. Возникает вопрос, будет ли такое соответствие соблюдаться при хемосорбции нуклеотидов апатитом? Главным из условий закономерного расположения сорбируемых молекул на грани является наличие в гидратированном слое (двумерного) кристаллического дальнего порядка. Напомним, вывод о наличии такого порядка был нами сделан ранее, в разделе 6.2, на основании имеющихся данных о природе гидратированного слоя. Кроме того, наличие кристаллического дальнего порядка непосредственно усматривается из изображения грани (10 $\bar{1}0$) кристалла гидроксилapatита, адсорбированной цитрат-анионы, полученного с помощью атомно-силовой микроскопии, Рис. 6-26. Ввиду единства

механизма адсорбции, есть основания надеяться и на закономерный характер распределения адсорбированных нуклеотидов на гранях апатита.

6.4.2. Укладка одноцепочечного полинуклеотида в основу.

При копировании полинуклеотидов (осуществлении реакции репликации ДНК или РНК, транскрипции или обратной транскрипции), цепочка, являющаяся матрицей, должна быть правильным образом расправлена в основе, как на Рис 5-1(А). Все фосфатные группы полинуклеотида должны поместиться закономерным образом в позиции одного ряда тетраэдров PO_4 на поверхности грани. На практике, однако, могут возникнуть различные нарушения, подобные показанным на Рис 5-1(В). Укладкой одноцепочечного полинуклеотида в основу мы будем называть процесс его хемосорбции апатитом, организованный таким образом, чтобы вся молекула или значительная её часть была правильным образом расправлена.

Как хорошо известно, в растворе молекулы ДНК и РНК спутаны в клубки. Вопрос о возможности разматывания клубков, вытягивании, распрямлении и фиксации молекул ДНК (одно- и двухцепочечных) на твёрдых поверхностях, таких как стекло, слюда и графит, интенсивно исследовался. Были найдены пути распрямления закреплённой с одного конца молекулы ДНК в потоке жидкости [467], при перемещения капли раствора или опускания мениска на границе раствор\воздух (т.н. *molecular combing*, [468,964,965]), посредством электрофореза, [966], в магнитном поле (т.н. *magnetic tweezers*, [967]) и другими методами. Добиться распрямления одноцепочечной ДНК, как оказалось, сложнее, нежели двухцепочечной, поскольку одноцепочечная молекула обнаруживает тенденцию стягиваться в петли за счёт образования уотсон-криковских пар основаниями нуклеотидов одной цепочки. Ещё одно затруднение проистекает из способности одноцепочечных ДНК прилипать к различным поверхностям, [970].

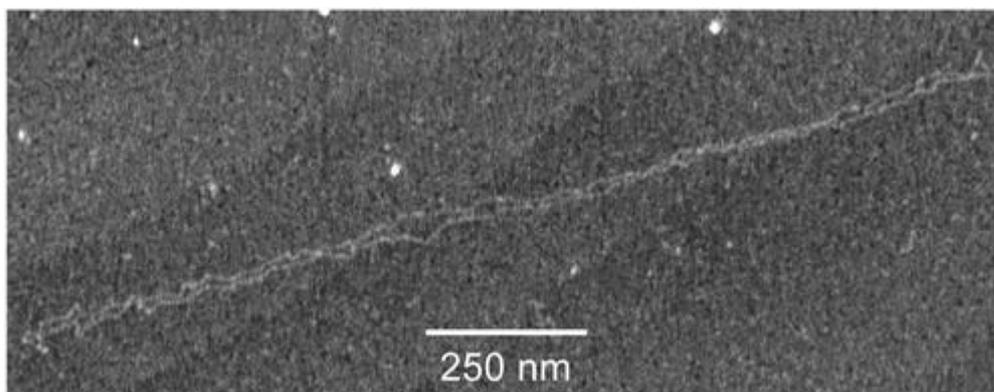


Рис 6-55. Изображение вытянутой молекулы одноцепочечной ДНК, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии (tapping mode) на подложке из слюды.

Из работы [969].

В качестве примера, изображение одноцепочечной ДНК, расправленной на поверхности слюды, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии, показано на Рис. 6-55. Достигаемая степень распрямления, очевидно, уступает той, которая нужна для правильной укладки матрицы в апатитовую основу. И тем не менее, есть основания полагать, что в случае апатита идеальное распрямление одноцепочечных полинуклеотидов на отрезках значительной длины в основе не только достижимо, но и добиться его будет сравнительно несложно. Природа сродства молекул полинуклеотидов к апатиту, обуславливающая механизм хемосорбции, при котором их фосфатные группы помещаются в позиции тетраэдров PO_4 кристаллической структуры, такова, что

правильное расположение полинуклеотида на грани соответствует термодинамическому равновесию.

При адсорбции одноцепочечных полинуклеотидов такими субстратами, как слюда, стекло или графит, состояние системы, в котором молекулы вытянуты вдоль прямых линий, не может быть равновесным. Изгибание молекулы практически не влияет ни на энергию связей внутри молекулы, ни на энергию связей между молекулой и субстратом. Тем самым, изгибание молекул не изменяет энтальпии системы, но в то же время ведёт к увеличению энтропии. Поэтому в равновесной конфигурации, соответствующей минимальному значению свободной энергии Гиббса, адсорбированные молекулы полимеров должны быть изогнуты более или менее хаотическим образом. При адсорбции полинуклеотидов апатитом ситуация прямо противоположная. Напомним (см. раздел 6.3.9), в качестве движущей силы процесса хемосорбции выступает энтропия, возникающая за счёт увеличения числа подвижных частиц при сорбции (а энтальпийный эффект адсорбции имеет второстепенное значение). Поэтому равновесному значению (минимуму) свободной энергии (и максимуму энтропии) соответствует то состояние системы, в котором максимально возможное число фосфатных групп полинуклеотида помещено в позиции тетраэдров PO_4 . Необходимость соблюдения принципов геометрического соответствия (длина фосфодиэфирной связи совпадает с межатомным расстоянием P–P в структуре) означает, что максимальное значение энтропии адсорбции достигается, если все фосфатные группы расположены в одном ряду тетраэдров PO_4 . То есть правильная укладка полинуклеотида в основу соответствует термодинамическому равновесию.

Коль скоро правильное расположение полинуклеотида в канве является равновесным, добиться его можно, выдержав грань, адсорбировавшую полинуклеотид, в растворе достаточно длительное время при достаточно высокой температуре, препятствующей образованию водородных связей между азотистыми основаниями. Вероятно, именно таким образом осуществлялась укладка матрицы в основу при репликации РНК на самом раннем этапе добиологической эволюции. Однако в лабораторных условиях кинетика перехода в стабильное состояние может оказаться замедленной, не позволяющей закончить эксперимент за приемлемое время. Необходимо, поэтому, предусмотреть способы ускоренного распрямления одноцепочечных полинуклеотидов в основу. Для этого могут быть использованы две стратегии: первая может основываться на тех же принципах, что и упоминавшиеся выше распрямление ДНК на стекле, слюде или графите, вторая – на использовании каталитической активности РНК.

Рассмотрим сначала вопрос о возможности адаптировать известные способы распрямления ДНК на твёрдых субстратах для укладки полинуклеотидов в апатитовую основу. При распрямлении ДНК один из концов молекулы фиксируют на поверхности субстрата. Для прикрепления молекулы к стеклу или слюде используется метод, получивший название *grafting* (прививка), [971]. Субстрат обрабатывают парами соединения 15-hexadecenyltrichlorosilane, $CH_2=CH(CH_2)_{14}\cdot SiCl_3$. Входящий в состав молекулы трихлорсилан связывается с поверхностью, реагируя с группами –ОН с образованием связей Si–O–Si, так что винильные группы –CH=CH₂ обращены вовне. Образующаяся при этом поверхность обладает необычными свойствами: ДНК связывается с ней, но только концевыми нуклеотидами (предположительно, вследствие наличия свободной протонированной фосфатной группы на 5'-конце молекулы, [468]).

Весьма примечательно, что производные силана могут быть использованы для модифицирования поверхности гидроксилapatита посредством *grafting*, в полной аналогии с обработкой стекла и слюды, описанными в предыдущем параграфе [963]. При этом группа ОН гидроксилapatита реагирует с силанами образуя связи P–O–Si, [963]. Это обстоятельство позволяет использовать методику закрепления ДНК одним концом на стекле, используемую в [468,971], для фиксирования на кристалле апатита одного конца укладываемой в основу молекулы полинуклеотида. Наличие на поверхности кристалла

групп –ОН составляет необходимое условие *grafting*. Если в качестве основы используются кристаллы других разновидностей апатита, таких как хлорапатит или бромапатит, их следует предварительно промыть в дистиллированной воде. При этом их поверхность становится вполне аналогичной поверхности гидроксилapatита (а при последующей обработке раствором, соответственно, NaCl или NaBr анионный состав поверхности восстанавливается).

Как ясно из вышеизложенного, укладываемую в основу молекулу одноцепочечного полинуклеотида можно закрепить одним концом на поверхности грани кристалла апатита (выбранной в качестве основы), осуществив *grafting*. Поскольку *grafting* может повлиять на способность апатита адсорбировать нуклеиновые кислоты, обрабатывать следует лишь небольшой участок сорбирующей грани. Если теперь кристалл поместить в раствор полинуклеотидов в условиях, способствующих десорбции (повышенная концентрация фосфата), определённое число молекул полинуклеотидов свяжется одним концом с выделенным участком. Затем молекулы могут быть вытянуты вдоль оси z кристалла любым из перечисленных выше методов, например посредством электрофореза. После этого состав раствора следует изменить таким образом, чтобы возникли условия, способствующие адсорбции (вытеснив фосфат хлоридом или роданидом например). Поскольку молекулы вытянуты, а правильное их расположение в основе соответствует термодинамическому равновесию, молекулы самопроизвольно примут желаемое положение, поместив свои фосфатные группы в ряды тетраэдров PO_4 , вытянутые вдоль оси z кристалла.

Альтернативный подход к проблеме правильного расположения полинуклеотида в основе мог бы состоять в выведении методом селекции *in vitro* рибозима, выполняющего такую функцию. Весьма вероятно, именно в этом заключалась функция самых первых рибозимов, появившихся в природе. Поскольку правильная ориентация полинуклеотида в основе соответствует равновесной конфигурации, т.е. минимуму свободной энергии Гиббса, рибозим должен осуществлять свои функции без дополнительных затрат энергии (без затрат АТФ).

7. Выбор и изготовление основы.

Грань кристалла, выступающая в качестве основы, должна обладать адсорбционной активностью, при этом на поверхность грани должны выходить ряды тетраэдров PO_4 (строки), удовлетворяющие требованиям геометрического соответствия – расстояния между центрами тетраэдров должны совпадать с соответствующими расстояниями в двухцепочечных полинуклеотидах:

- (1) Расстояние между центральными атомами соседних тетраэдров PO_4 в строке должно быть близко к расстоянию между соседними фосфатными группами в полинуклеотиде – условие образования фосфодиэфирных связей.
- (2) Расстояния между центральными атомами тетраэдров PO_4 в паре связанных нуклеотидов из соседних строк должно быть близко к длине уотсон-криковской пары.
- (3) Расстояния между азотистыми основаниями нуклеотидов, поместивших свои фосфатные группы в соседние позиции тетраэдров PO_4 в строке, должно быть оптимальным для стэкинга.

При ближайшем рассмотрении выясняется, что характерные межатомные расстояния в известных структурных типах ДНК и РНК меняются в широких пределах. Поэтому для нас важно прояснить вопрос о вероятном диапазоне значений межатомных расстояний в синтезируемом полинуклеотиде и возможности получения апатитовых кристаллов, удовлетворяющих соответствующим критериям геометрического соответствия (1-3).

7.1. Структурные типы двухцепочечных полинуклеотидов.

Исходя из геометрических особенностей молекулы, различают три основных (т.е. имеющих наибольшее распространение) типа спиралей двухцепочечных полинуклеотидов: правозакрученные формы А и В и левозакрученная форма Z. Для ДНК при физиологических условиях устойчива В-форма, которая при определённых условиях может обратимо переходить в А- или Z-ДНК. Для РНК известна только А-форма (некоторые олигомеры РНК необычного состава переходят в Z-форму при высоком гидростатическом давлении и высокой концентрации одновалентных катионов). Химерные молекулы, состоящие из одной цепочки ДНК и одной комплементарной ей цепочки РНК, как правило, существуют в виде А-формы. Однако обнаружено несколько В - олигомеров химер ДНК-РНК, [460]. Усреднённые расстояния фосфат – фосфат для двух соседних нуклеотидов одной цепочки В-, А- и Z-форм составляют, соответственно, 6.7 Å, 5.3 Å и 5.1 Å, [461,460,464]. Напомним, фосфатные группы в цепочке полинуклеотида связаны через фуранозные кольца рибоз. Столь значительная вариативность расстояния P–P объясняется способностью фуранозных колец гофрироваться многими способами (т.н. *sugar pucker*). На каждый нуклеотид в сахарно-фосфатном остове полимера (*sugar-phosphate backbone*) приходится шесть поворотных степеней свободы. Иначе говоря, имеется шесть углов связей, которые можно изменять независимо один от другого, не меняя длин связей. Далее, длина уотсон-криковских пар тоже может меняться в широких пределах, причём в этом случае, помимо способности фуранозных колец менять форму, включаются дополнительные степени свободы, ассоциированные с вращением гликозидной связи. Водородные связи, соединяющие азотистые основания уотсон-криковских пар, тоже способны менять длину, но в узких пределах. Согласно [462], длина кратчайшей водородной связи для фиксированной пары нуклеотидов может меняться не более чем на 0.5 – 0.7 Å. Наконец, усреднённые расстояния между азотистыми основаниями соседних нуклеотидов в цепочке для А-, В- и Z- форм составляют, соответственно, 2.4 Å, 3.4 Å и 3.7 Å, т.е. и здесь вариации значительны.

Примечательно, что при столь значительных геометрических отличиях, переход от одной формы ДНК к другой осуществляется без затрат значительных количеств энергии. Например, свободная энергия превращения Z-формы в B-форму (в пересчёте на моль пар нуклеотидов) составляет 2 kJ/mol для poly(dG·dC) и около 5 kJ/mol для poly(dA·dT), [460]. Энтальпии превращения B- в Z-ДНК (на моль пары нуклеотидов) составляют 2.0 kcal/mol для poly(dG·dC), 4.0kcal/mol для poly(dA·dT) и 3.1kcal/mol для poly(dAdC)·poly(dGdT), [463]. Будучи геометрически неэквивалентными, различные формы ДНК почти эквивалентны термодинамически, и это свидетельствует о легкой деформируемости полинуклеотидов.

Характерные расстояния в трёх структурных типах полинуклеотидов варьируют в столь широких пределах, что практически в любом ортофосфате можно обнаружить грань, удовлетворяющую требованиям (1-3). Однако рассмотрение структурных отличий A-, B- и Z-форм полинуклеотидов приводят к выводу, что ориентироваться целесообразнее на геометрические характеристики полинуклеотидов B-типа.

Структурные различия между A-, B- и Z-формами двухцепочечных полинуклеотидов определяются различием в механизме взаимодействия их с молекулами воды, образующими водородные связи, главным образом, с атомами немостикового кислорода фосфатных групп, кислорода и азота азотистых оснований (детально обсуждаются в главе 10). При этом распределение молекул воды со стороны большой бороздки во всех трёх формах обнаруживает полиморфизм и вариативность, не согласующуюся с периодичностью спирали. Поэтому считается, что эти молекулы не имеют структурообразующей роли. В противоположность им распределение молекулы воды в малой бороздке обнаруживает периодичность, согласующуюся с периодичностью двухцепочечной спирали, и по этой причине их считают структурообразующими.

Выше, при обсуждении механизма возникновения полимераз посредством миниатюризации кристалла-основы, на основании общих закономерностей строения полимераз разных структурных типов, в разделе 5.10.2 был сделан вывод об ориентации двухцепочечных полинуклеотидов на основе. Полинуклеотид, поместивший свои фосфатные группы в позиции PO₄ основы, был обращён к основе той стороной, которая соответствует большой бороздке. Поэтому противоположная сторона – соответствующая малой бороздке – должна была контактировать с раствором. Поскольку характером взаимодействия именно этой стороны полинуклеотида с молекулами воды определяется структурный тип полинуклеотида, можно предположить, что структурные особенности полинуклеотида, адсорбированного основой, окажутся близки к особенностям одного из типов: A-, B- и Z-формы.

По данным рентгеновской кристаллографии олигомеров ДНК, указанные три типа ДНК различаются особенностями их *sugar pucker*, которыми, в частности, обусловлены все геометрические различия между A- и B-ДНК. Кроме того, все нуклеотиды в B- и A-ДНК имеют конформацию *anti*, тогда как в Z-форме имеет место чередование: пурины имеют *syn*-конформацию, а пиримидины - *anti*. Чередование *syn*- и *anti*-конформаций приводит к возникновению зигзагов в двойной спирали Z-ДНК (вследствие чего она и поименована «Z»). Нерегулярная, зигзагообразная структура Z-ДНК плохо согласуется с правильным расположением фосфатных групп вдоль по прямой на грани кристалла, поэтому возникновение подобной структуры на основе представляется крайне маловероятным.

Возникновение при стемпинге структура A-типа тоже маловероятно ввиду особенностей взаимодействия её фосфатных групп с молекулами воды. В A- и Z-формах соседние фосфатные группы в цепочках соединяются молекулами воды, а в B-ДНК фосфатные группы гидратируются индивидуально, [460,464,465,469]. Поскольку фосфатные группы полинуклеотидов, расправленных в основе, не имеют возможности взаимодействовать с водой, характерный для A- типа характер гидратирования фосфатов оказывается невозможен. Однако именно этим взаимодействием определяется характерная для A- типа малая величина расстояния P-P фосфодиэфирной связи. Тем

самым, при выборе состава и грани кристалла апатита используемого в качестве основы имеет смысл ориентироваться на геометрические параметры молекул В-ДНК.

Таблица 7-1. Расстояния между примыкающими фосфатными группами в олигомере со структурой В-ДНК.

B-DNA d(CGCGAATTCGCG) ^a			
1 (P2-P3)	6.6	(P14-P15)	6.6
2 (P3-P4)	6.5	(P15-P16)	6.5
3 (P4-P5)	6.8	(P16-P17)	7.1
4 (P5-P6)	6.9	(P17-P18)	6.8
5 (P6-P7)	6.9	(P18-P19)	6.7
6 (P7-P8)	6.3	(P19-P20)	6.7
7 (P8-P9)	6.9	(P20-P21)	6.7
8 (P9-P10)	6.7	(P21-P22)	6.2
9 (P10-P11)	6.6	(P22-P23)	6.6
10 (P11-P12)	7.1	(P23-P24)	6.7
		mean +/- SD	6.7 +/- 0.2

Из работы [461].

Впрочем, геометрические параметры молекул В-ДНК тоже могут меняться в широких пределах. Например, в Таблице 10 показаны определённые рентгенографически расстояния P – P между примыкающими фосфатными группами одной цепочки олигомера со структурой В-ДНК, [461]. Как можно видеть, эти расстояния варьируют от 6.2 Å до 7.1 Å, в среднем составляя 6.7 Å. В напряжённых формах полинуклеотидов это расстояние может быть значительно короче. Например, в четверное соединении В-ДНК, расстояния между центрами фосфатных групп варьирует от 4.96 до 6.9 Å, см Таблицу 4-2. В целом, отклонение расстояния P – P для фосфодиэфирной связи в В-форме полинуклеотида от среднего значения в сторону уменьшения представляется более вероятным, чем в сторону увеличения. В пользу этой гипотезы также свидетельствует тот факт, что в А- и Z-формах полинуклеотидов расстояние P – P существенно меньше, чем в В-форме.

Подводя итог, выбор межатомных расстояний в В-ДНК в качестве модели адсорбированного апатитом полинуклеотида приводит к следующим геометрическим критериям соответствия:

- (VI) Расстояние между центральными атомами соседних тетраэдров PO₄ в строке должно быть близко к 6.7 Å, при этом важно зарезервировать возможность изменения в сторону уменьшения.
- (VII) Расстояния между центральными атомами тетраэдров PO₄ в уотсон-криковской паре нуклеотидов должно быть близко к 18 Å.
- (VIII) Расстояния между азотистыми основаниями нуклеотидов, поместивших свои фосфатные группы в соседние позиции тетраэдров PO₄ в строке, должно быть оптимальным для стэкинга, т.е. близко к 2.5 – 3 Å или (при использовании интеркалятов) к 5 – 6 Å.

7.2. Кристаллохимические критерии выбора основы.

В целях удобства, названия часто упоминаемых разновидностей кальциевого апатита будут в данном разделе заменены символами: FAr – для фторапатита, ClAr – хлорапатита, ONAr – гидроксилapatита, а бромапатит будет обозначаться как BrAr.

Грань кристалла апатита, выступающая в роли основы при синтезе полинуклеотидов, должна проявлять адсорбционную активность, при этом на ней должны быть расположены ряды тетраэдров PO₄, удовлетворяющие сформулированным выше критериям геометрического соответствия (VI-VIII). Для получения полинуклеотидов достаточной длины, по объёму кодируемой информации приближающихся к природным

макромолекулам, нужны кристаллы миллиметровых размеров, однородные, без полисинтетических двойников мозаичности и иных дефектов сходной природы.

Дефектность в апатите может возникнуть в результате фазовых переходов, в связи с тем, что температура приготовления кристаллов, как правило, значительно выше диапазона температуры, в котором устойчивы нуклеотиды. ClAp , например, испытывает фазовое превращение при $\sim 220^\circ \text{C}$ с понижением симметрии до моноклинной. Подобные превращения часто сопровождаются возникновением мозаичности кристалла. К счастью, высокотемпературная гексагональная фаза легко может быть стабилизирована введением примесей (а также вакансий) в кристалл. Известные случаи полиморфизма кальциевого апатита имеют место только для стехиометрических ClAp и HAp . Небольшого количества примесей в апатите (до 5-10%), как правило, бывает достаточно для стабилизации гексагональной фазы при всех температурах вплоть до комнатной.

При выборе состава кристалла апатита, используемого в качестве основы, можно воспользоваться результатами главы 6. При обсуждении данных об адсорбции молекул с кислотными группами в этой главе нами сделан вывод, что в роли сорбирующей грани выступает некоторая грань призмы, и что сорбируемых полимеры вытянуты вдоль оси z кристалла. Тот факт, что расстояние между центрами карбоксильных, фосфатных и фосфонатных групп при адсорбции, соответственно, пиррофосфата, бисфосфонатов и цитрата совпадает с величиной $c/2 = 0.34 \text{ nm}$, подсказывает, каким образом можно удовлетворить нашему требованию (VI). Расстояние, на которое должны быть разнесены центральные атомы соседних тетраэдров PO_4 в строке, оказывается близко к величине параметра $c = 6.7 \text{ \AA}$. Поскольку $c/2$ – это расстояние P–P между ближайшими атомами, цепочки полинуклеотидов должны быть вытянуты вдоль оси z кристалла, и их фосфатные группы должны укореняться в позиции тетраэдров PO_4 через одного, Рис 7-3, 7-4. Поскольку, как был сказано выше, величина 6.7 \AA представляет собой верхнюю оценку, возникает вопрос о возможности приготовления кристаллов апатита с величиной параметра $c < 6.7 \text{ \AA}$. При этом может возникнуть необходимость изменения параметра a решётки в ту или другую сторону для удовлетворения наших критериев (VII-VIII). Возможность выбора состава апатита, удовлетворяющего этим требованиям, обсуждается ниже.

Данные о кристаллохимии апатита. Минералы группы апатита, напомним, имеют общую формулу $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, где X – это обычно F (фторапатит, FAp), OH (гидроксилапатит, HAp) или Cl (хлорапатит, ClAp). Одна из отличительных особенностей апатита в том, что его кристаллическая решётка допускает необычайное разнообразие изоморфных замещений. В общей сложности более половины элементов таблицы Менделеева могут быть в той или иной форме размещены, в существенных количествах, в структуре апатита, [470]. В природных апатитах X может быть замещён на $\frac{1}{2}\text{CO}_3$ или $\frac{1}{2}\text{O}$; Ca на Sr, Ba, Pb, Na, Fe, REEs и вакансии; PO_4 – на HPO_4 , AsO_4 , VO_4 , SiO_4 или CO_3 , [471]. В лабораторных условиях были также получены кристаллы, в которых PO_4 частично или полностью замещён на SO_4 , MnO_4 , GeO_4 , CrO_4 , VO_4 , BeF_4 , а X частично или полностью замещён на Br (бромапатит, BrAp), J, $\frac{1}{2}\text{S}$, купрат и др. Недавно для некоторых разновидностей гидроксилапатита была обнаружена ещё одна схема замещения, при которой ион 3d-металла (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) входит в позицию H^+ , [472].

Представленный здесь анализ выполнен в условиях доступа лишь к части имеющихся сведений и потому носит несколько предварительный характер. Параметры элементарной ячейки нескольких фосфатов со структурой апатита, представляющих наибольший интерес, приведены в Таблице 7-2.

Таблица 7-2. Параметры элементарной ячейки некоторых фаз со структурой апатита.

№	Формула	a(Å)	c(Å)	c/a	Источн ик
1	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	9.410	6.879	0.731	[473]
2	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F	9.363	6.878	0.735	[473]
3	Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl	9.5902	6.7666	0.706	[474]
4	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ ClF	9.441	6.835	0.724	[475]
5	Ca ₅ (PO ₄) ₃ Br	9.761	6.739	0.714	[476]
6	Ca ₅ (PO ₄) ₃ Br	9.6482	6.7788	0.703	[474]
7	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ Cu _{0.20} O _{0.56} (OH) _{1.28}	9.4145	6.8811	0.731	[473]
8	Ca ₁₅ (PO ₄) ₉ JO [†]	9.567	20.758	0.723	[477]
9	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S	9.455	8.840	0.934	[477]
10	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	9.432	6.881	0.730	[477]
11	Mn ₅ (PO ₄) ₃ Cl	9.54	6.20	0.650	[333]
12	Mn ₅ (PO ₄) ₃ Cl _{0.9} (OH) _{0.1}	9.532	6.199	0.650	[356]
13	Cd ₅ (PO ₄) ₃ OH	9.335	6.664	0.714	[477]
14	Cd ₅ (PO ₄) ₃ F	9.30	6.63	0.713	[333]
15	Cd ₅ (PO ₄) ₃ Cl	9.625	6.504	0.676	[477]
16	Cd _{4.92} (PO ₄) ₃ Cl _{0.907}	9.633	6.484	0.673	[477]
17	Cd _{4.82} (PO ₄) ₃ Br _{1.52}	9.733	6.468	0.665	[477]
18	Na ₂ Ca ₆ Sm ₂ (PO ₄) ₆ F ₂	9.3895	6.8950	0.734	[477]
19	Ca ₉ Ni(PO ₄) ₆ F ₂	9.364	6.870	0.734	[478]
20	Ca ₉ Mg(PO ₄) ₆ F ₂	9.355	6.867	0.734	[478]
21	Ca ₉ Mg(PO ₄) ₆ (OH)F	9.386	6.861	0.731	[479]
22	Ca _{7.3} Co _{2.7} (PO ₄) ₆ F ₂	9.347	6.833	0.731	[480]
23	Ca _{5.6} Co _{4.5} (PO ₄) ₆ Cl ₂	9.644	6.749	0.700	[480]
24	Ca ₅ Cd ₅ (PO ₄) ₆ F ₂	9.12	6.71	0.736	[470]
25	Хлорапатит с 3.06% Cr	9.56	6.73	0.704	[481]

[†] Сверхструктура.

Верхние десять строк Таблицы 7-2, отведенные кальциевым разновидностям апатита, могут быть использованы в качестве иллюстрации влияния «малого» аниона X. Как можно видеть, ClAp и BrAp имеют наименьшее значение параметра c; замена Cl на любой другой анион изменяет параметр c в сторону увеличения. Заметно различающиеся (на 0.04 Å) параметры для BrAp из двух разных источников, помещённые в пятой и шестой строчках таблицы, иллюстрируют трудно учитываемое влияние условий синтеза. В обеих публикациях, [474] и [476], кристаллы BrAp получены флюсовой методикой, и в качестве флюса в обеих использован CaBr₂.

При рассмотрении данных о параметрах элементарных ячеек примерно двухсот фаз со структурой апатита, представленных в [471,472,473,475, 477, 478,480,484,485,486,487, 488], обнаруживаются следующие тенденции. Из числа разновидностей апатита, имеющих широкое распространение в природе, ближе других к интересующей нас величине параметра c (6.7 Å) подходит ClAp – его параметр c равен 6.77 Å (т.е. превосходит ожидаемое значение примерно на один процент). BrAp, в природе не встречающийся, имеет близкое значение, а ребро c ячейки наиболее широко распространённых в природе разновидностей – FAp и OHAp – на 0.12 Å длиннее.

Если катионный состав минерала фиксирован, то апатит, в котором в качестве «малого» аниона X фигурирует Cl или Br, всегда имеет наименьшее значение параметра c. Эта тенденция убедительно просматривается для всех катионов. Далее, практически все изученные возможности замещения PO₄ на другие анионы также приводят к увеличению параметра c. (За одним исключением: незначительное уменьшение параметра c имеет место при некоторых гетеровалентных заменах с замещением фосфата на карбонат.) Упомянутые выше замещения H⁺ на ион 3d-металла также сопровождаются увеличением (и значительным) параметра c. Тем самым, единственная возможность для уменьшения параметра c состоит в замещении Ca²⁺ в ClAp и BrAp, частичном или полном, на меньшие по размеру катионы, такие как Co²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, Cr³⁺, Al³⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺.

Из рассмотрения имеющихся данных следует, что замещение Ca^{2+} в апатите на катион меньшего ионного радиуса не всегда сопровождается образованием апатита с меньшими параметрами элементарной ячейки. В ряде случаев наблюдается лишь незначительное уменьшение параметра c , кроме того подобные замены в катионной подрешётке часто приводят к дестабилизации апатитовой структуры и возникновению новых фаз, изоструктурных трёхкальциевому фосфату (β -ТСП, см. Таблицу 6-1), витлокиту (whitlockite, $\text{Ca}_9(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})(\text{PO}_4)_6(\text{PO}_3\text{OH})$), вагнериту (wagnerite, $\text{Mg}_2\text{PO}_4\text{F}$) и др. Экспериментальные данные, позволяющие судить о возможности частичного или полного замещения Ca в ClAp или BrAp , имеются не для всех представляющих интерес катионов, для остальных приходится довольствоваться результатами кристаллохимических обобщений и корреляций.

Существенного уменьшения параметра c можно добиться, вводя в катионную подрешётку апатита Mn^{2+} или Cd^{2+} , [478,]; при этом, в случае хлорапатита, первая замена сопровождается уменьшением параметра a , а вторая – увеличением, см. строки 11-17 Таблицы 7-2. Замена Ca^{2+} на такие катионы, как Sb^{3+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} позволяет уменьшить параметр c ClAp не более чем на 0.12 \AA (для указанных четырёх катионов возможно лишь частичное замещение). Для Sb^{3+} это связано низкими пределами замещения, [489], а вхождение Mg^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} , при высоких, до 30% mol, пределах замещения, мало сказывается на величине параметров элементарной ячейки, [478,480,490].

Ввиду недостаточной изученности или недоступности публикаций, остается неясным, можно ли существенно уменьшить параметр c апатита замещая Ca^{2+} на Fe^{2+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} или Cu^{2+} . Предварительные выводы можно сделать исходя из значений радиусов этих ионов. Связь устойчивости структуры апатита с величиной радиусов ионов была исследована эмпирически авторами [478] для случаев, когда $X=\text{F}$ и $X=\text{Cl}$. Согласно их выводам, радиус двухвалентного иона в позиции Ca фторапатита и хлорапатита лежит, соответственно, в пределах $0.95 \text{ \AA} \leq R_c \leq 1.35 \text{ \AA}$ и $0.80 \text{ \AA} \leq R_c \leq 1.35 \text{ \AA}$. Тем самым хлорапатит обнаруживает бóльшую толерантность в отношении катионов малого радиуса. Данная закономерность (неожиданная, поскольку ионный радиус F^- значительно меньше радиуса Cl^-) прослеживается также и для частичных замещений: максимальная возможная степень замещения Ca^{2+} на катион малого ионного радиуса в ClAp обычно в два-три раза выше чем в FAp .

В работе [491], посвящённой исследованию структуры кристаллов железистого гидроксид-оксиапатита состава $[\text{Ca}_{10-x}\text{Fe}_x^{3+}][(\text{PO}_4)_6][(\text{OH})_{2-x}\text{O}_x]$, ($0 \leq x \leq 0.5$), найдено, что вхождение Fe^{3+} в позиции Ca сопровождается увеличением параметра c решётки апатита; кроме того примесь Fe^{3+} способствует превращению апатита в β -ТСП. В литературе встречаются упоминания замещения $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ в FAp , сопровождающееся уменьшением параметра c . Поскольку ионный радиус Fe^{2+} ниже чем у Ca^{2+} , упоминавшаяся выше толерантность ClAp к замене кальция на меньший катион, превосходящая таковую FAp , предполагает возможность частичного замещения кальция в ClAp на двухвалентное железо, которое тоже должно сопровождаться уменьшением параметра c . Экспериментальных исследований такого замещения мне найти, пока, не удалось.

Пределы гетеровалентного замещения кальция алюминием в OHAp , FAp и ClAp (а также параметры решётки) исследованы в недоступной мне публикации [492].

В работе [481], опубликованной в 1941 г., получен кальциевый хлорапатит с высоким содержанием хрома, параметр c которого существенно ниже чем у ClAp (последняя строка в Таблице 10). Кристаллы, судя по данным «мокрого» химического анализа, содержат Cr^{6+} наряду с Cr^{2+} . Пределы замещений определены не были. Подобные кристаллы, согласно описанию, легко могут быть получены кристаллизацией из расплава, но перспективы использования их в качестве основы пока не очевидны.

Ионный радиус Zn^{2+} , 0.88 \AA , лежит вблизи нижней границы интервала значений, допускающих образование хлорапатита (но значительно ниже соответствующей границы

для фторапатита), поэтому, в отсутствие экспериментальных данных, вопрос о возможности существенного уменьшения параметра c апатита путём введения в его состав цинка остаётся открытым. Упоминания о кристаллических осадках цинковых фосфатов именуемых цинковым гидроксилпироморфитом ($Zn_5(PO_4)_3OH$, *zink hydroxypromorphite*) и цинковым хлорпироморфитом ($Zn_5(PO_4)_3Cl$, *zink chloropromorphite*) имеются в исследованиях, посвященных извлечению тяжелых металлов из промышленных стоков, см. [493-495]. Поскольку минерал пироморфит ($Pb_5(PO_4)_3Cl$) изоструктурен апатиту, речь несомненно, идёт о цинковом гидроксил- и хлорапатите. Эти фазы, судя по выводам, помещённым в *abstracts*, образуются при взаимодействии кристаллического кальциевого апатита с водными растворами солей цинка. Кристаллические осадки, состоящие из HAp с переменным количеством цинка, были получены в [496-498]. Параметр a элементарной ячейки уменьшается с увеличением концентрации Zn до 10 % mol, а затем начинает увеличиваться; параметр c монотонно уменьшается во всей области гомогенности. О получении FAp , в котором 25 % mol Ca замещено на Zn сообщается в работе [499]. В целом, получение цинковых или цинксодержащих хлор- и бромапатита представляется вполне решаемой задачей, однако каких-либо цифр, позволивших оценить параметры их элементарных ячеек в моём распоряжении пока нет.

Ионный радиус иона Cu^{2+} (0.87 Å), как и у цинка, лежит вблизи нижней границы значений, допускающих образование соответствующего хлорапатита. Перспективы получения хлор- и бромапатита с высоким содержанием меди пока не ясны. Авторы недоступного мне исследования [500] получили $ОНАр$ с высоким содержанием меди и определили параметры его элементарной ячейки. При получении медьсодержащих разновидностей апатита необходимо иметь в виду, что ион Cu^{2+} может входить в позиции Ca^{2+} , а также, в виде купрата, в позиции «малого» аниона X . Первая схема замещения сопровождается уменьшением параметра c , а вторая – увеличением. Условия получения купрат-apatита описаны в публикации [473] и содержащихся в ней ссылок.

Подводя итог, с кристаллохимической точки зрения, в качестве наиболее подходящего материала для изготовления основы следует выбрать $ClAp$ или $BrAp$, ион Ca^{2+} в которых частично или полностью замещён на катионы меньшего ионного радиуса. Параметр c решётки кальциевых $ClAp$ и $BrAp$ практически совпадает (в пределах 1-2%) с характерным расстоянием $P-P$ фосфодиэфирной связи $B-DHK$. Частичное замещение Ca^{2+} на катионы меньшего радиуса, такие как Mn^{2+} , Cd^{2+} и, вероятно, Zn^{2+} , позволяет плавно уменьшить величину параметра c . Задача направленного изменения параметра a , не изменяя существенным образом величины параметра c , тоже представляется вполне решаемой, поскольку отношение параметров a/c для фаз со структурой апатита варьирует в широких пределах, см. пятую колонку в Таблице 7-2. Некоторого изменения параметра a можно также добиться, замещая Ca^{2+} на Co^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и другие катионы.

Ввиду наличия достаточно большого количества катионов, способных осуществить желаемые вариации параметров решётки апатита, у нас появляется возможность не только удовлетворить сформулированным выше требованиям (VI-VIII), но и стимулировать каталитическую активность апатита, важную для завершения реакции образования фосфодиэфирной связи за приемлемое время (см. ниже, глава 9).

7.3. Приготовление кристаллов кристаллов хлор- и бромапатита.

При осуществлении синтеза полинуклеотидов методом стемпинга возникает необходимость в приготовлении довольно крупных апатитовых кристаллов (до нескольких миллиметров). Согласно выводам, сделанным в предыдущем разделе, скорее всего, в качестве основы могут быть использованы монокристаллы $ClAp$ и $BrAp$. Ниже приведены выборочные сведения о получении таких кристаллов. Литература,

посвященная приготовлению апатитовых кристаллов и различных материалов на его основе, необычайно обширна. Ниже упоминаются лишь некоторые работы, свидетельствующие, что приготовление кристаллов ClAp и BrAp, в целом, не составляет сложной задачи.

Кристаллы ClAp миллиметровых размеров могут быть выращены из раствора в расплаве CaCl_2 [501-503] или NaCl [504,505,506]. Манипулируя такими параметрами, как количество флюса, температура и скорость остывания, можно получить кристаллы призматического, Рис. 7-1, игольчатого или тонковолокнистого габитуса, Рис. 7-2. Метод может быть использован для введения в кристаллы ClAp различных примесей, [502]. Описание флюсовой методики приготовления монокристаллов BrAp имеется в [507]; приготовление монокристаллов промежуточного состава между FAp и ClAp во флюсе на основе CaCl_2 описано в [475].

Отклонение от стехиометрии является важным параметром, который необходимо контролировать при получении кристаллов ClAp и BrAp флюсовым методом. Например, согласно [508], нагреванием стехиометрического $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ в вакууме можно удалить до 23% содержащегося в нём CaCl_2 без разрушения кристаллической структуры и без появления второй фазы. Симметрия решётки при этом понижается до моноклинной (пространственная группа $\text{P}2_1/\text{b}$). Для получения стехиометрических кристаллов ClAp (BrAp) все манипуляции с тиглем производят в атмосфере азота с HCl (HBr).

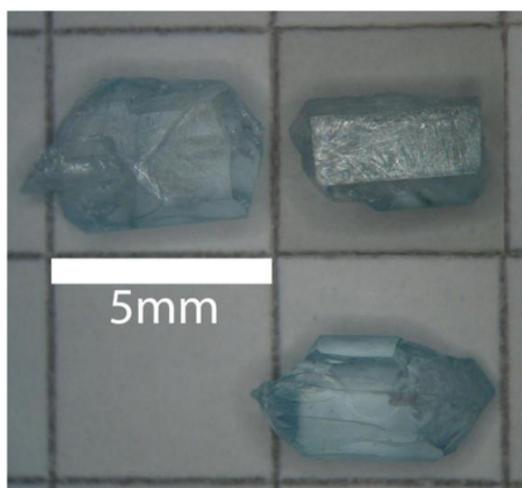


Рис 7-1. Кристаллы хлорапатита, выращенные во флюсе на основе CaCl_2 .
Из работы [502]

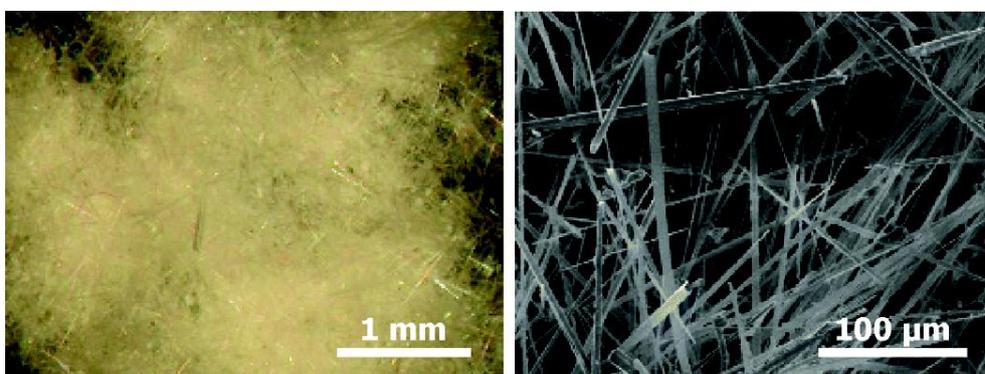


Рис 7-2. Кристаллы хлорапатита, выращенные во флюсе на основе NaCl .
Из работы [505].

Гидротермальные методики получения кристаллов С1Ар изложены в [509,510]. Было также разработано большое количество методов получения FАр, которые не сложно адаптировать для получения С1Ар и ВгАр. В [511], например, идиоморфные кристаллы FАр получены при 150° С во флюсе, представляющем собой эвтектическую смесь KNO₃ и LiNO₃. Возможности золь-гель метода обсуждаются в диссертации [512], а методы соосаждения изложены в статье [513].

Получение кристаллов С1Ар и ВгАр, в которых кальций частично или полностью замещён на кадмий или марганец, не должно вызвать затруднений ввиду стабильности этих разновидностей апатита во всём диапазоне составов. В работе [478], например, керамика, состоящая из Mn₅(PO₄)₃Cl, была получена спеканием порошков Mn₃(PO₄)₂ и MnCl₂. Аналогичную реакцию можно будет провести во флюсе, состоящем из смеси CaCl₂ и MnCl₂. Изменяя отношение Ca/Mn во флюсе можно будет получить кристаллы любого состава от Ca₅(PO₄)₃Cl до Mn₅(PO₄)₃Cl. В случае броматапата, аналогичный синтез осуществить несколько проще ввиду более низкой температуры плавления бромидов. Кроме того, марганцовистые разновидности апатита могут быть приготовлены гидротермально. В работе [514] этим методом были получены кристаллы состава Mn₅(PO₄)₃Cl_{0.9}(OH)_{0.1}. Кристаллы Cd-содержащих С1Ар и ВгАр не сложно будет вырастить в галогенидных флюсах, судя по тому что в [478] кадмиевый хлоратапатит был получен спеканием порошков Cd₃(PO₄)₂ и CdCl₂ при 770° С. Кроме того, в докладе [515] представлены данные, свидетельствующие о лёгкости взаимодействия кристаллов НАр с расплавом CdCl₂ с образованием апатита промежуточного состава.

7.4. Идентификация сорбирующих граней.

Грань кристалла апатита, способная выступить в качестве основы, имеет на своей поверхности ряды тетраэдров PO₄, расположение которых согласуется с нашими требованиями (VI-VIII). Определение таких граней из кристаллохимических соображений наталкивается на затруднения принципиального свойства. Первое состоит в том, что нам не известны геометрические параметры связей в нуклеиновых кислотах, адсорбированных апатитом. Выше уже неоднократно отмечалось, что как расстояние P-P для уотсон-криковской пары, так и расстояние P-P для фосфодиэфирной связи определяются характером гофрирования фуранозных колец рибоз нуклеотидов (т.н. *sugar pucker*). Коль скоро при адсорбции нуклеотидов их рибозы, притянутые фосфатными группами к поверхности минерала, испытывают на себе наиболее интенсивное (по сравнению с другими частями молекулы) воздействие поверхности, характер гофрирования их фуранозных колец не может быть выяснен без специальных экспериментов.

Второе затруднение, препятствующее непосредственному выявлению сорбирующих граней из кристаллохимических принципов, состоит в недостаточности наших знаний о поверхности грани кристалла. Неизвестно, насколько велики могут быть отклонения её от идеальной плоскости. Характер затруднений удобнее пояснить на конкретных примерах.

В элементарной ячейке С1Ар содержится шесть атомов P (расположенных в центрах соответствующих тетраэдров PO₄) с координатами

$$\begin{array}{ccc} (x, y, \frac{1}{4}) & (1-y, x-y, \frac{1}{4}) & (y-x, 1-x, \frac{1}{4}) \\ (1-x, 1-y, \frac{3}{4}) & (y, y-x, \frac{3}{4}) & (x-y, x, \frac{3}{4}) \end{array}$$

где $x=0.3690$ и $y=0.3985$. . (Координаты x и y приведены в масштабе параметров ячейки a , b и c , причём $a=b$). Значения координат приведены для кристаллов FАр ввиду отсутствия в моём распоряжении координат атомов для С1Ар, но для наших целей этого

достаточно, поскольку согласно Эллиоту [90], координаты атомов Р практически совпадают для всех разновидностей кальциевого апатита

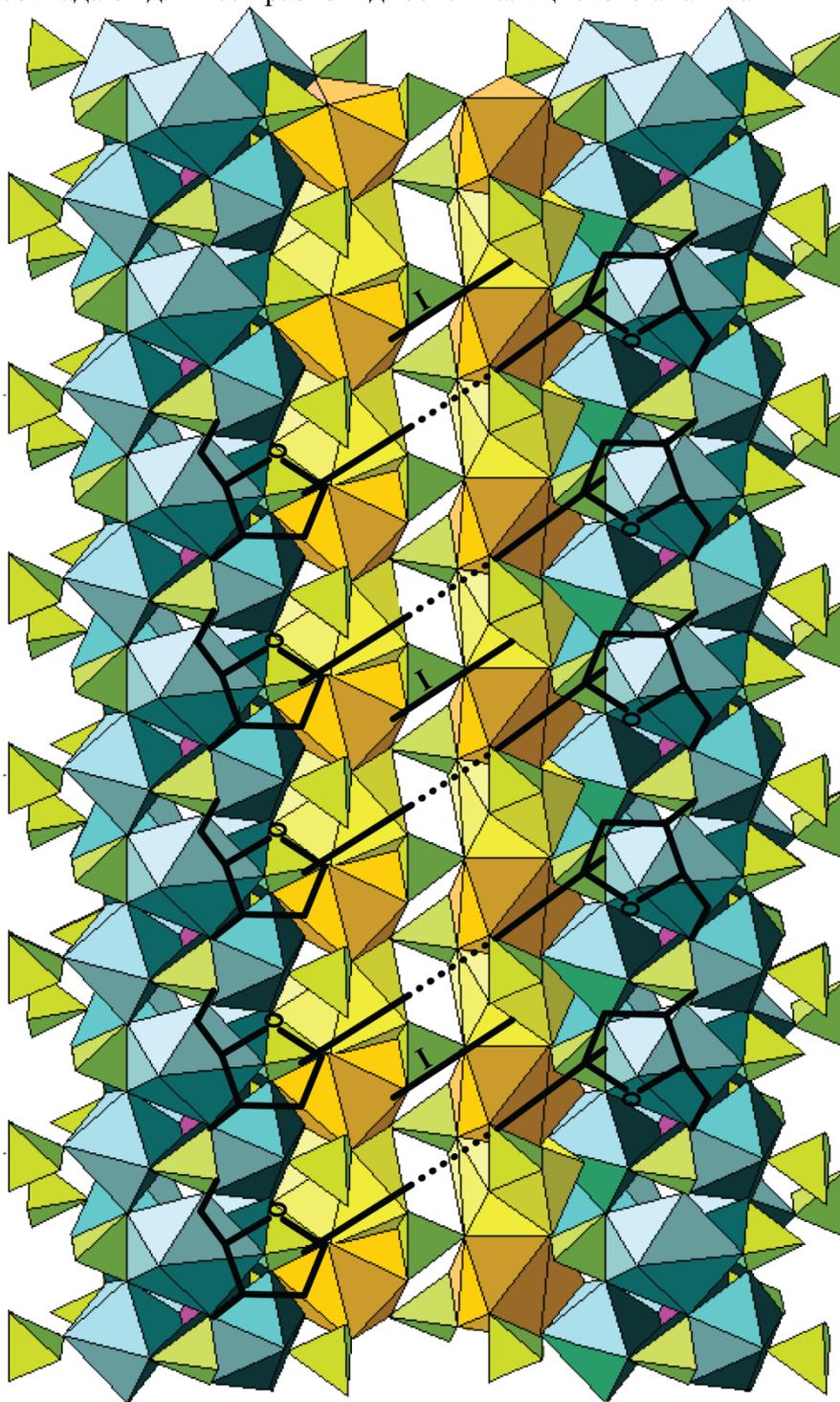


Рис 7-3. Схема одного из возможных способов расположения строчки из уотсон-криковских пар на грани призмы $[11\bar{2}0]$ кальциевого хлоратапата (вид сверху). Фосфатные группы пары нуклеотидов располагаются в позициях с координатами $(x, y, n + \frac{1}{4})$ и $(x+1, y+1, n + \frac{1}{4})$, $n = 0, 1, 2, \dots$ Азотистые основания нуклеотидов, расположенные вертикально, в плоскостях перпендикулярных поверхности грани, показаны полосками. Молекулы интеркалирующего агента, расположенные между азотистыми основаниями, обозначены буквой «I». Угол между осью удлинения уотсон-криковской пары и осью строчки (параллельной оси z кристалла) составляет 78° , т.е. заметно отклоняется от прямого угла. (Для данной иллюстрации использовано изображение фторапатита, в хлоратапате атомы «малого» аниона X (показанные фиолетовыми шарами) несколько смещены вдоль оси z кристалла, но это практически не

сказывается на координатах центров тетраэдров PO_4 , показанных зелёным цветом. Синим и оранжевым показаны координационные полиэдры атомов кальция.

Рассмотрим два тетраэдра PO_4 с центрами $(x, y, \frac{1}{4})$ и $(x+1, y+1, \frac{1}{4})$. Плоскость, проходящая через указанные две точки параллельно оси z кристалла, очевидно, параллельна грани призмы $[11\bar{2}0]$. Нетрудно показать, что расстояние между двумя этими точками составляет $\sqrt{3a^2 + c^2}$. Подставляя значения параметров a и c кальциевого С1Ар, приведённых в третьей строке Таблицы 7-2, получаем, что для этой разновидности апатита указанное расстояние составляет 17.94 Å, т.е. практически совпадает с длиной уотсон-криковской пары. Учитывая, что параметр c ячейки кальциевого С1Ар практически совпадает с шириной уотсон-криковской пары В-ДНК (расстоянием Р-Р между соседними нуклеотидами в цепочке), нетрудно видеть, что расположение нуклеотидов в строке, показанное на Рис 7-3, удовлетворяет всем нашим требованиям (VI-VIII).

К сожалению, удовлетворение геометрически критериев соответствия (VI-VIII), само по себе, не гарантирует возможности использования грани $[11\bar{2}0]$ в качестве основы. С одной стороны, у нас не может быть полной уверенности в равенстве геометрических параметров связей в адсорбированных нуклеотидах с таковыми в В-ДНК. Кроме того, угол между осью удлинения уотсон-криковской пары и осью удлинения строчки (параллельной оси Z кристалла в данном случае) в обсуждаемом случае оказался равен 78°. Рассмотрение структурных особенностей биокатализаторов, выполненное ниже в главе 9, приводит к выводу, что этот угол должен быть близок к 90°. В противном случае возможны затруднения при образовании переходного состояния, необходимого для каталитического образования фосфодиэфирных связей. Остаётся неясным, достаточно ли значение интересующего нас угла близко к 90°, и не создаст ли это затруднений при каталитическом образовании фосфодиэфирной связи.

Ещё один повод для сомнений в возможности использования рядов из пар тетраэдров PO_4 с центрами $(x, y, \frac{1}{4})$ и $(x+1, y+1, \frac{3}{4})$ состоит в том, что тетраэдры в паре не связаны через центр инверсии или ось вращения второго порядка. Выше, в разделе 4.3 указывалось на возможную связь локальной симметрии сорбирующей грани со взаимной ориентацией цепочек в полинуклеотидах, образуемых стемпингом. Антипараллельная ориентация цепочек более вероятна, если тетраэдры PO_4 решётки, соответствующие фосфатным группам одной уотсон-криковской пары связаны через центр инверсии или через поворот вокруг оси второго порядка. Однако при конфигурации, показанной на Рис 7-3), два тетраэдра получаются один из другого трансляцией на вектор (1,1,1). Тем самым, ситуация оказывается неопределённой.

Рассмотрим теперь два тетраэдра PO_4 с центрами $(1-x, x-y, \frac{1}{4})$ и $(x-y, x, 2\frac{3}{4})$.

Указанные две точки, как нетрудно убедиться, не лежат на одной плоскости параллельной грани $[11\bar{2}0]$, однако, вследствие того, что координаты x и y имеют сходную величину, существует грань параллельная $[11\bar{2}0]$, такая что обе позиции оказываются вблизи её и тем самым должны быть доступны для замещения фосфатными группами нуклеотидов.

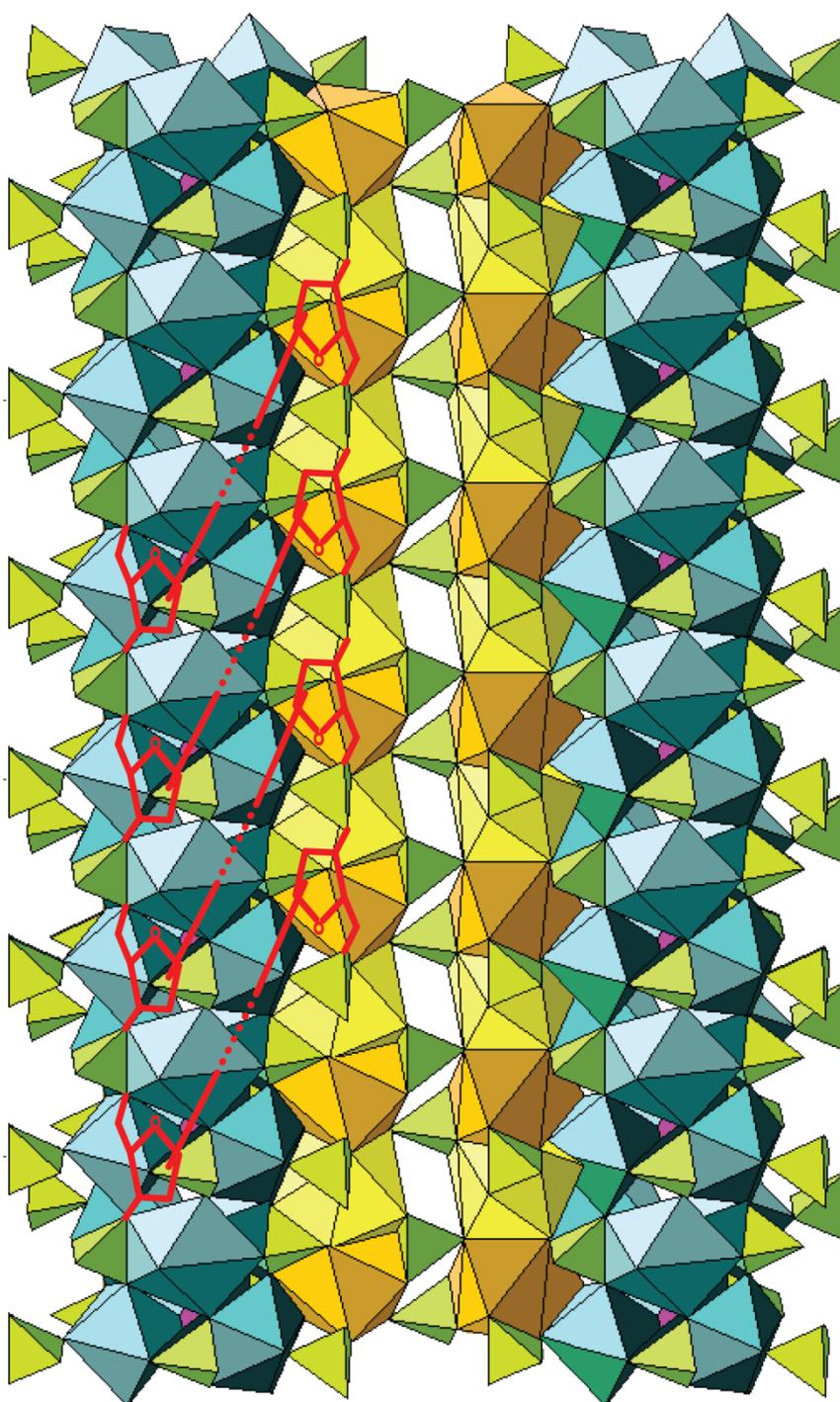


Рис 7-4. Схема одного из возможных способов расположения строчки из уотсон-криковских пар на грани призмы $[11\bar{2}0]$ кристалла хлорпатита промежуточного состава в ряду $(\text{Ca}, \text{Mn})_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$. Интеркалирующий аген отсутствует. Стэкинг осуществляется непосредственно примыкающими азотистыми основаниями нуклеотидов.

Гипотетическая строчка из уотсон-криковских пар, с фосфатными группами в позициях

$$(1-x, x-y, n+\frac{1}{4}) \text{ и } (x-y, x, n+2\frac{3}{4}), \text{ где } n=0,1,2,\dots,$$

показана на Рис 7-4. При этом в случае Ca-ClAp расстояние между центрами фосфатных групп составляет 19.1 Å, т.е. на 1 Å больше чем нужно, а для Mn-ClAp аналогичное расстояние оказывается равным 16.8 Å, что на 1 Å меньше желаемого. Очевидно,

непрерывная серия твёрдых растворов $(\text{Ca}, \text{Mn})_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ покрывает весь диапазон возможных значений длины утсон-криковской пары, при этом параметр c обеих разновидностей апатита близок к расстоянию P–P в фосфидиэфирной связи. Поэтому грань $[11\bar{2}0]$, весьма вероятно, может быть использована в качестве основы для некоторого промежуточного твёрдого раствора в указанном ряду составов. Остаётся неясным, смогут ли адсорбированные нуклеотиды соединиться фосфодиэфирными связями, поскольку угол между осью удлинения утсон-криковской пары и осью удлинения пары является острым (а согласно выводам главы 9 образованию фосфодиэфирной связи способствует величина угла близкая к 90°).

Ещё один пример грани, потенциально пригодной для использования в качестве основы, обнаруживается при рассмотрении пары тетраэдров с координатами

$$(x, y, n + \frac{1}{4}) \text{ и } (x + 2, y, n + \frac{1}{4}), \text{ где } n = 0, 1, 2, \dots$$

Все эти точки располагаются на грани, параллельной грани призмы $[10\bar{1}0]$. При этом наши требования (VI–VIII) удовлетворяются с высокой точностью для Cd–FAp с параметрами, указанными в строке 14 Таблицы 7-2. К сожалению, данный способ стемпинга не проиллюстрирован графически, потому что в моём распоряжении нет подходящего изображений структуры апатита в проекции на грань $[10\bar{1}0]$.

Приведённые рассуждения показывают, что с одной стороны, подходящая грань и желательный состав апатита, используемого в качестве основы, не могут быть предсказаны *a priori*, а с другой, имеется целый ряд граней, потенциально подходящих на роль основы для апатита различного состава. В этих условиях возникает необходимость в методе одновременного исследования большого числа граней. Такой метод предложен ниже.

Эмпирическая идентификация грани, способной выступить в роли основы. Для поиска грани кристалла апатита определённого состава, способной выступить в роли основы для стемпинга, может быть использована способность кристаллов самоограняться. Известно, что сфера, механически выточенная из монокристалла, будучи помещена в насыщенный раствор того же соединения, начинает самоограняться. На раннем этапе этого процесса на сфере образуется большое количество граней, представляющих самые разные простые формы. Впоследствии быстрорастущие грани зарастают, и набор представленных простых форм упрощается и сокращается по мере того, как огранка кристалла приближается к равновесной. Экспериментальная демонстрация этого явления была впервые осуществлена М.П. Шаскольской на примере кристалла алюмо-калиевых квасцов, помещённого в насыщенный водный раствор той же соли. Описание опыта имеется, например, в монографии [435].

Если сферу, механически выточенную из монокристалла апатита, поместить в раствор, насыщенный апатитом того же состава, её самоогранение должно привести к развитию граней различных простых форм. Осуществление полимеризации нуклеотидов на поверхности такой сферы позволит выявить грани, наиболее подходящие на роль основы. По завершении реакции, поверхности таких граней будут покрыты адсорбированными полинуклеотидами, обнаружить которые можно с помощью интеркалирующих красителей или с помощью атомно-силового микроскопа.

При наличии достаточно крупных монокристаллов (порядка полумиллиметра и больше), придание им сферической формы не составляет проблемы. Можно, например, обкатать кристаллы апатита и придать им сферическую форму в устройстве, использовавшемся раньше, более 10 лет назад, для подготовки кристаллов к прецизионному рентгеноструктурному анализу (использование кристаллов сферической формы существенно упрощает введение поправок на поглощение).

8. О влиянии адсорбции на нековалентные взаимодействия в полинуклеотидах.

В схеме синтеза полинуклеотидов, осуществляемого стемпингом, предполагается, что азотистые основания нуклеотидов, адсорбированных основой, должны взаимодействовать так же, как они взаимодействуют в свободных двухцепочечных нуклеотидах (т.е. в отсутствие сорбента). В действительности же *a priori* не очевидно, будут ли азотистые основания адсорбированных нуклеотидов образовывать уотсон-криковские пары, и возможно ли стэкинг-взаимодействие для таких оснований. Имеются экспериментальные свидетельства того, что поверхность сорбирующих граней апатита несёт отрицательный заряд (см. раздел 6.3). Тем самым возникает опасность, что положительно заряженные азотистые основания будут притянуты к поверхности сорбента за счёт электростатических взаимодействий, и в результате и стэкинг и образование водородных связей в уотсон-криковских парах будут заблокированы.

Опасность нарушения взаимодействий между нуклеотидами вследствие электростатического притяжения их азотистых оснований отрицательно заряженной поверхностью апатита вполне реальна. Взаимодействия сходной природы описаны для боковых цепей адсорбированных апатитом бисфосфонатов (раздел 6.3.3). По такому же механизму осуществляется и адсорбция основных протеинов апатитом – за счёт притяжения положительно заряженных аминогрупп на поверхности глобул протеина отрицательно заряженной поверхностью минерала. К счастью, указанных затруднений легко избежать. Притяжение азотистых оснований к поверхности кристалла можно заблокировать так же, как блокируется притяжение к ней положительно заряженных аминогрупп при элюировании основных белков растворами электролитов в апатитовой хроматографии.

В апатитовой хроматографии, напомним (раздел 6.1), основные протеины элюируются (т.е. смываются с сорбента) путём поддержания в растворе достаточно высокой ионной силы. Обычно для этого используется раствор NaCl. Очевидно, тем же способом можно будет добиться и десорбции азотистых оснований. При этом известно, что повышение концентрации NaCl приводит к усилению взаимодействия фосфатных групп адсорбированных нуклеотидов с кристаллом. Таким образом, поддержание высокой ионной силы в растворе приведёт к отсоединению азотистых оснований от поверхности минерала и вместе с тем усилит сцепления фосфатных групп нуклеотидов с основой. В итоге нековалентные взаимодействия между нуклеотидами будут осуществляться так, как это имеет место в двухцепочечных полинуклеотидах.

Экспериментальные исследования взаимодействия нуклеиновых кислот с апатитом немногочисленны, но они выполнены в растворах электролитов. И в этих данных (обсуждавшихся ранее в разделе 6.3.8) усматриваются признаки и стэкинг-взаимодействия, и образования уотсон-криковских пар.

Напомним, характерная сигмоидная форма кривых адсорбции ADP и ATP (Рис. 6-48 и 6-49), согласно выводам авторов [433], возникает вследствие взаимного притяжения между близкорасположенными нуклеотидами, возникающего за счёт стэкинга. В этой связи интересно отметить, что отчётливое сигмоидное искривление наблюдается только на изотермах адсорбции этих двух соединений. Остальные кривые адсорбции – пирофосфата, этидроната и хлодроната (Рис. 6-11 и Рис 6-15), цитрата и фосфоцитрата (Рис. 6-23), стазерина (Рис.6-38) и сывороточного альбумина (Рис. 6-44) – таких искривлений не обнаруживают, видимо потому, что указанные соединения не содержат ароматических групп, способных, за счёт стэкинга, придать хемосорбции характер кооперативного явления. (Некоторые указания на сигмоидное искривление просматривается в кривых адсорбции полиакриловой кислоты, (Рис. 630), и причины этого остаются невыясненными.)

Вопрос о сохранении водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов в уотсон-криковских парах адсорбированных полинуклеотидов исследован в цитированной выше работе [446]. Согласно этим данным, фиксирование двухцепочечной ДНК на поверхности апатита приводит к упрочнению водородных связей в уотсон-криковских парах и к повышению температуры денатурации.

9. Об использовании катализаторов.

Процесс полимеризации нуклеотидов посредством стемпинга апатитовой основы включает в себя соединение нуклеотидов фосфодиэфирными связями, образующимися после того как нуклеотиды поместили свои фосфатные группы в позиции тетраэдров PO_4 основы. Реакция образования фосфодиэфирной связи принадлежит к классу химических реакций, называемых реакциями переноса фосфата. Реакции этого типа относятся к числу самых медленных в биохимии, [516]. Например, скорость реакции гидролиза фосфодиэфирной связи обратной (реакции, обратной реакции образования фосфодиэфирной связи) такова, что, согласно имеющимся оценкам, гидролиз половины фосфодиэфирных связей в РНК при физиологических условиях, но в отсутствие катализаторов должен произойти за ~ 110 лет, а в ДНК – за $\sim 10^8 - 10^{10}$ лет, [517]. В живых клетках реакции переноса фосфата осуществляются при посредстве ферментов, являющихся наиболее эффективными из всех известных катализаторов. Например, фосфодиэстеразы способны ускорить гидролитический разрыв фосфодиэфирной связи в $10^{15} - 10^{21}$ раз, [517].

Замедленный характер реакции образования фосфодиэфирных связей может стать источником затруднений при полимеризации нуклеотидов посредством стемпинга. Для преодоления указанного затруднения, если оно возникнет, может быть предложено несколько способов. Определённый опыт использования катализаторов был накоплен в обсуждавшихся выше (раздел 3.2) работах по конденсации преактивированных нуклеотидов, [55-57], матричному синтезу [67-70] и каталитическому синтезу олигомеров РНК на монтмориллонитовой подложке [60-65]. Не исключено, что те же подходы к катализу образования фосфодиэфирной связи окажутся полезными при осуществлении реакций стемпинга. Ещё одна возможность состоит в использовании интронов группы I. Каталитическое образование фосфодиэфирной связи при полимеризации нуклеотидов стемпингом апатита, вероятно, составляло одну из функций этого рибозима на стадии добиологической эволюции (раздел 5.1.2). Однако выбор наиболее подходящего природного рибозима или его усовершенствование посредством эволюции *in vitro* потребуют дополнительных затрат. Ещё одна возможность состоит в использовании собственной каталитической активности апатита, используемого в качестве основы. Наличие у гидроксилapatита активности киназы показано в работах [115-117], гидроксилapatит и фторапатит, согласно [328], катализируют реакцию фосфорилирования нуклеозидов до нуклеозидмонофосфатов (см выше, раздел 5.3.2.). Кроме того, при исследовании адсорбции пирофосфата апатитом было обнаружено, что этот минерал катализирует реакцию гидролиза пирофосфата с образованием ортофосфата (раздел 6.3.1). Тем самым, имеется несколько примеров катализа апатитом реакций переноса фосфата. Наконец, при абиогенной полимеризации нуклеотидов могут быть использованы сведения о механизмах действия биокатализаторов.

Необычайная эффективность ферментов и рибозимов, катализирующих реакции переноса фосфатов, вызвала к жизни многочисленные исследования, в ходе которых были накоплены детальные сведения о строении их активных центров. Было также исследовано влияние различных факторов среды на функционирование активных центров. Особый интерес с точки зрения приложений представляют работы, посвящённые разработке искусственных катализаторов в виде небольших молекул, воссоздающих структуру активного центра биокатализаторов, успешно катализирующих, например, гидролиз фосфодиэфирной связи.

Примечательный факт состоит в том, что каталитические стратегии, обнаруживаемые в активных центрах биокатализаторов, воспроизводимые искусственно в виде небольших молекул, легко могут быть перенесены в контекст стемпинга (в котором они, вероятно, и возникли). В настоящей главе собраны сведения о строении активных центров ферментов и рибозимов, катализирующих реакции переноса фосфата, и об опыте имитации

задействованных в них каталитических стратегий. Из этих описаний становится очевидным, как конфигурации атомов, имитирующие активные центры, могут быть созданы на поверхности апатита при стемпинге для ускоренного образования фосфодиэфирных связей. Кроме того, обсуждение задействованные в центрах каталитических стратегий подсказывает решение ряда практических вопросов стемпинга: какой должна быть ориентация нуклеотидов в цепочке, следует ли воспользоваться интеркалирующими агентами, следует ли модифицировать катионный состав апатита основы, и какими катионами имеет смысл модифицировать состав его гидратированного слоя.

9.1. Активные центры ферментов и рибозимов, катализирующих реакции переноса фосфата.

В биохимических системах обнаружено два типа реакций, в которых имеет место соединение двух нуклеотидов фосфодиэфирной связью или разрыв такой связи. На Рис. 9-1 они проиллюстрированы на примере реакций, катализируемых рибозимами. В реакции, известной как аутосплайсинг (*self-splicing*) имеет место разрыв фосфодиэфирной связи с возникновением 5'-ОН и 2'-3' циклофосфата на образующихся концах, Рис. 9-1(a). С химической точки зрения, эта реакция представляет собой перенос фосфодиэфирной связи, т.н. *transesterification*. В последующем изложении она будет именоваться *перезэтерификацией*. При реакции, именуемой расщеплением (в случае обратной реакции – лигированием) фосфодиэфирной связи имеет место образование 5'-фосфата и 3'-гидроксила, Рис. 9-1 (b). Данная реакция протекает с участием молекулы воды и потому представляет собой гидролиз фосфодиэфирной связи.

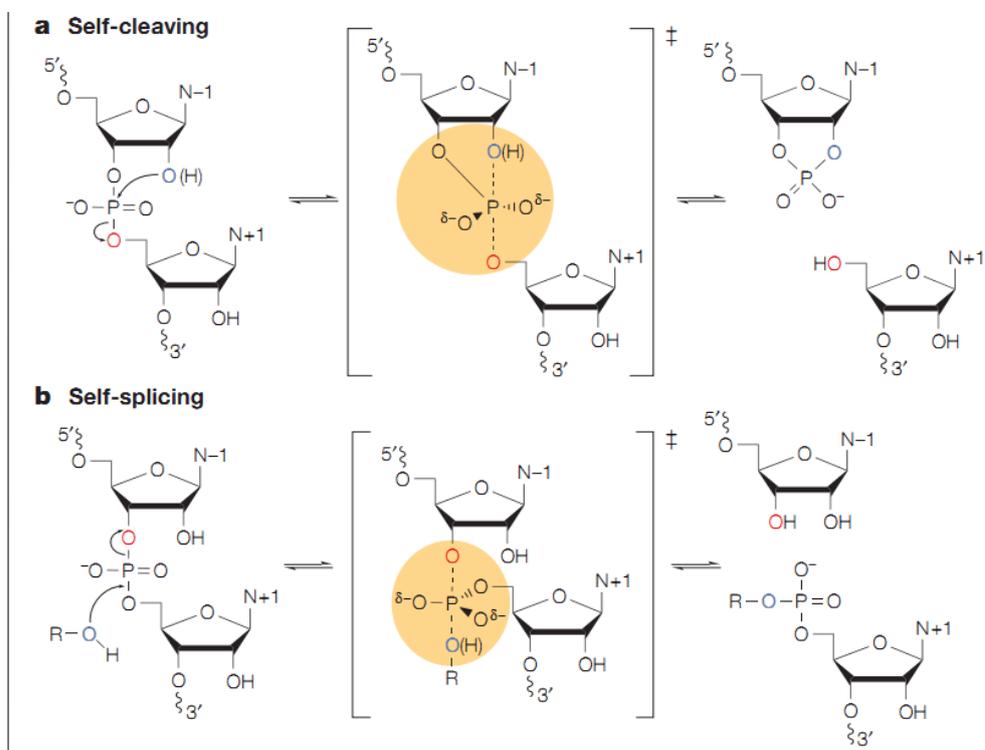


Рис. 9-1. Два типа реакций, сопровождающихся образованием/разрывом или переносом фосфодиэфирной связи: (a) перезэтерификация; (b) гидролиз.

Полимеризация нуклеотидов на основе может быть осуществлена как одна из указанных двух реакций – переэтерификацией или в реакции, обратной гидролизу фосфодиэфирной связи, смотря по тому, какая форма мононуклеотидов использована в качестве исходной. Помимо гидролиза фосфодиэфирной связи и её переэтерификации, нам понадобятся сведения о нескольких ферментах и рибозимах, катализирующих ряд других реакций с переносом фосфата.

Нам понадобятся некоторые сведения о терминологии, используемой при описании эфиров фосфорной кислоты и ферментов, катализирующих реакции с их участием. Различают три вида эфиров ортофосфорной кислоты: моно-, ди- и триэфиры, Рис 9-2. Триэфиры в природе не встречаются; появление триэфиров в биохимии обусловлено использованием их в качестве пестицидов.

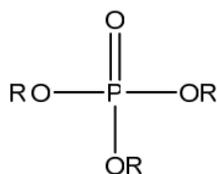


Рис. 9-2. Общая структура эфиров ортофосфорной кислоты: моноэфир ($R' = R'' = \text{H}$, $R \neq \text{H}$), диэфир ($R'' = \text{H}$, R и $R' \neq \text{H}$), триэфир (R , R' и $R'' \neq \text{H}$).

В биохимии ферменты, катализирующие реакции с переносом фосфата, классифицируют по типу фосфоэфирной связи, разрываемой или образуемой в процессе реакции, Рис. 9-3. Ферменты, катализирующие гидролиз триэфиров, т.н. фосфотриэстеразы (*phosphotriesterases*) на рисунке не обозначены, потому что на момент написания обзора, из которого схема заимствована (1980 г.), об их существовании ещё не было известно. Фосфотриэстеразы были позднее обнаружены в некоторых насекомых и живущих в почве бактериях, проявляющих устойчивость к действию пестицидов, содержащих триэфиры фосфорной кислоты.

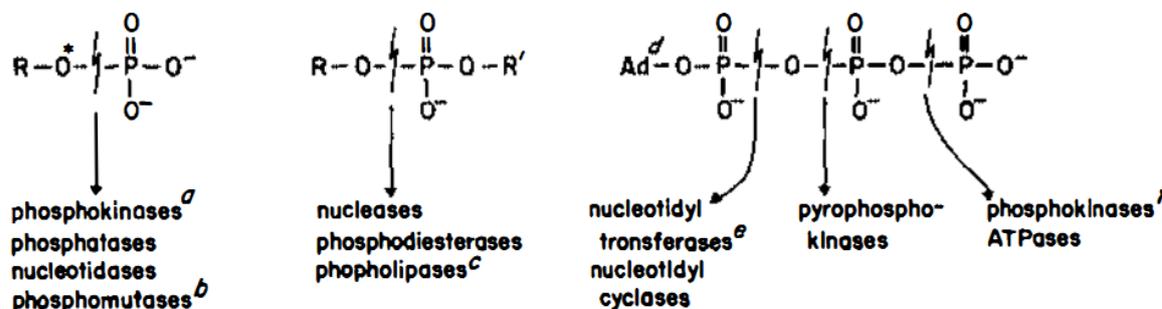


Figure 1 Classes of enzyme that catalyze reactions at phosphorus. *a*, the starred atom may be an oxygen of a hydroxyl, carboxyl, or phosphoryl group, or the nitrogen of a guanidino group; *b*, the phosphoryl group is transferred (formally intramolecularly) between two hydroxyl groups or between a hydroxyl and a carboxyl group; *c*, phospholipase C and D; *d*, Adenosine; *e*, includes such ligases as aminoacyl tRNA synthetases; *f*, includes such ligases as glutamine synthetase and acetyl-CoA carboxylase.

Рис. 9-3. Классификация ферментов, катализирующих реакции с переносом фосфата, по типу связи образуемой/разрываемой в процессе реакции.

Хотя ферментов и рибозимов, катализирующих реакции с переносом фосфата известны тысячи, вопрос о выборе нескольких характерных представителей, наиболее подходящих для имитации, оказывается проще, чем можно было предположить. Из общих соображений, например, можно было бы считать, что активный центр полимеразы, осуществляющий образование фосфодиэфирной связи при сборке полинуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов, представляет меньший интерес, нежели центр активности 3'-5'-

эксонуклеазы в той же полимеразе. В самом деле, первый центр для соединения нуклеотидов использует энергию трифосфатов, а второй гидролизует фосфодиэфирную связь без использования дополнительных источников энергии. Можно было бы предположить, что топоизомераза I, фермент, который разрешает топологические проблемы, связанные со спирализацией и деспирализацией ДНК, более перспективен, чем 3'-5'-эксонуклеаза, потому что первый осуществляет как разрыв, образование и фосфодиэфирных связей равновесным путём, а второй – нет. Подобным же образом, имитация ферментов, катализирующих образование фосфодиэфирных связей, подобных таковым в ДНК и РНК, может показаться более перспективной, чем ферментов, катализирующих образование моноэфиров. На практике, как ни странно, перечисленные различия оказываются второстепенными.

Один из фундаментальных выводов современной энзимологии и состоит в том, что при всём поистине феерическом разнообразии структур исследованных ферментов и рибозимов, катализирующих интересные нас реакции, их активные центры устроены достаточно просто. Активные центры ферментов могут быть разбиты на несколько типов, так что центры сходного строения зачастую катализируют разные реакции. Известны ферменты, катализирующие реакции с переносом фосфата, обладающие широкой специфичностью, такие как щелочная фосфатаза, отщепляющая фосфат от многих типов молекул, включающих белки, нуклеотиды, алкалоиды, неорганические полифосфаты. То есть в данном случае один и тот же активный центр катализирует широкий спектр реакций. Есть примеры противоположной тенденции, когда обширная группа ферментов, катализирующих различные реакции, оказывается связанной общностью происхождения. При этом активные центры ферментов группы оказываются сходными или почти идентичными, при всём разнообразии субстратов и даже при отличиях в природе образуемой/разрываемой связи. Например, среди ферментов из т.н. *haloacid dehalogenase superfamily*, помимо ферментов, катализирующих разрыв связей C–Cl (*dehalogenases*), имеются также аденозинтрифосфатазы, фосфонатазы (*phosphonatas*), катализирующие гидролиз связи P–C и ряд других, см. Таблицу 9-1.

Таблица 9-1. Примеры ферментов из the haloacid dehalogenase superfamily.

Из обзора [518].

Table 1. Prominent members of the haloacid dehalogenase superfamily sorted by class and reaction type

Enzyme	Class	Substrate
C–Cl cleavage		
2-L-haloalkanoic acid dehalogenase	I	2-L-Haloalkanoic acid
C–P cleavage		
Phosphonoacetaldehyde hydrolase	I	Phosphonoacetaldehyde
CO–P cleavage		
Phosphoserine phosphatase	I	L-Phosphoserine
Mitochondrial 5'-(3')deoxyribonucleotidase	I	dUTP
Sucrose-6 ^F -phosphate phosphatase	II	Sucrose-6 ^F -phosphate
Mg ²⁺ -dependent phosphatase (MDP1)	III	Protein phosphotyrosine
8KDO phosphatase	III	3-Deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate
CO–P cleavage/formation (mutase)		
β-phosphoglucomutase	I	β-Glucose 1-phosphate
Phosphomannomutase	II	α-Mannose 1-phosphate
PO–P cleavage		
Sarcoplasmic Ca ²⁺ -ATPase	I	ATP
Cu ²⁺ /H ⁺ -ATPase	I	ATP

В дополнение к сказанному, среди ферментов катализирующих реакции с переносом фосфата нередки примеры сходного строения активных центров у ферментов из различных групп, не связанных филогенетически. Более того, сопоставление активных центров некоторых ферментов и рибозимов продемонстрировало, что в них задействованы сходные каталитические стратегии, возникшие, как считают, вследствие конвергентной эволюции, [519,520]. Имеет смысл, поэтому, разбить ферменты и рибозимы, осуществляющие реакции переноса фосфата, на классы согласно структурным

особенностям их активных центров, а не особенностям химизма катализируемых реакций. Таких типов усматривается три: центры, содержащие ароматические группы, центры с ионами двухвалентных металлов и, наконец, центры, содержащие ионы металлов наряду с ароматическими

9.1.1. Центры, не содержащие ионов металла.

Отличительная особенность активных центров рассматриваемых здесь ферментов и рибозимов заключается в том, что они не утрачивают каталитическую активность в отсутствие двухвалентных ионов металлов. Центры данного типа всегда содержат имидазольные группы. Для обсуждения выбраны лишь два примера – один фермент и один рибозим, изученные с особой тщательностью.

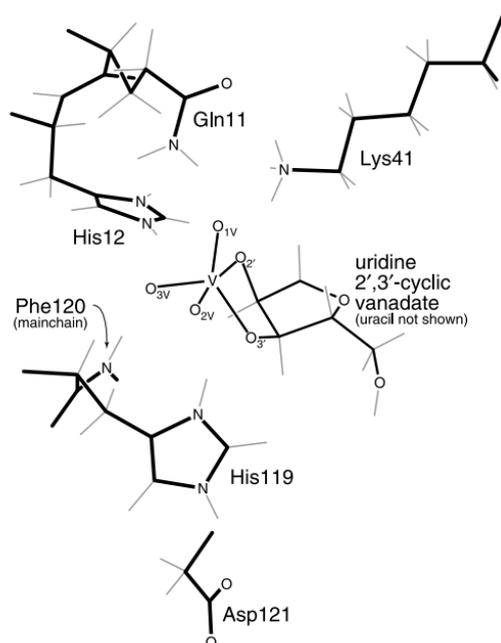


Рис 9-4. Кристаллическая структура активного центра фермента RNase A химически связанного с циклическим 2'-3' ванадатом уридина. Особенности распределения электронной плотности в ванадате (форма, размеры, аномальное рассеяние), как полагают, близки к таковым в фосфате в переходном состоянии. *Из обзора [513].*

Рибонуклеаза А (RNase А) представляет собой фермент, относящийся к группе эндонуклеаз, который гидролизует фосфодиэфирные связи в одноцепочечных РНК. RNase А является наиболее детально изученным белком за всю историю биохимии, [521]. Этот фермент, сравнительно недавнего происхождения, обнаруживается только у позвоночных животных [517]. Одна из отличительных особенностей фермента в том, что он сохраняет каталитическую активность в отсутствие ионов двухвалентных металлов.

Согласно наиболее распространённой точке зрения, [513], гидролиз фосфодиэфирной связи рибонуклеазами протекает в две стадии, Рис. 9-5 (а). На первой, быстрой, стадии происходит переэтерификация с образованием 2',3'-циклофосфата. На следующей стадии, значительно более медленной, циклофосфат гидролизуется молекулой воды. Долгое время было принято считать, что стадия переэтерификации протекает обратимо, а гидролиз необратим (под обратимостью, в данном случае, имеется в виду возможность осуществить ту же реакцию в обратном направлении). В 2000 г. в диссертации [512] было показано, что необратимость гидролиза – это артефакт, происходящий от избытка воды. Реакция, катализируемая рибонуклеазами RNase А и (обсуждаемой ниже) RNase Т1, может быть обращена, если в качестве растворителя использована смесь воды и метанола.

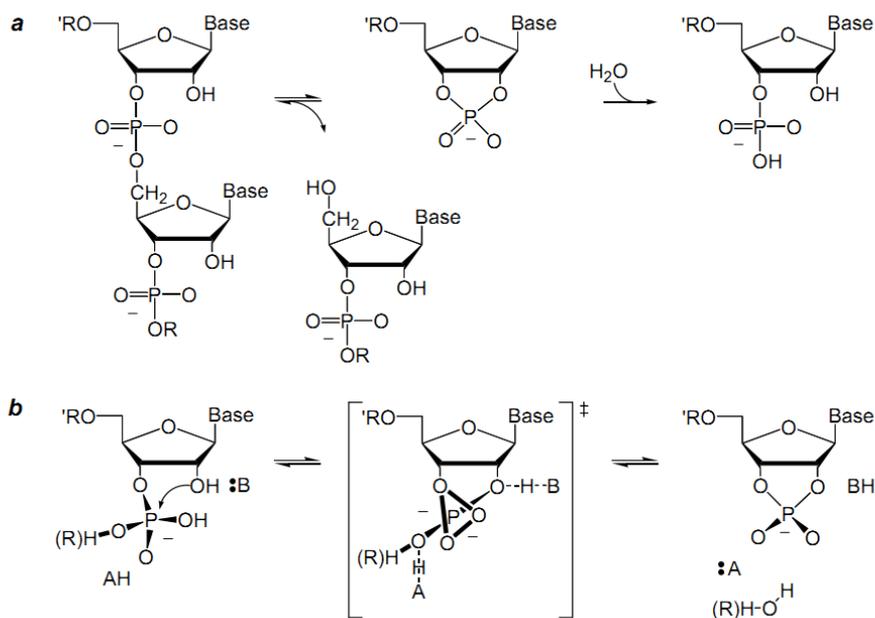


Рис 9-5. Схема гидролиза РНК, катализируемого рибонуклеазами: **(а)** Двухстадийный механизм. Обратимая трансэтерификация с образованием 2',3'-циклофосфата, за которой следует необратимый гидролиз. **(б)** Одностадийный механизм, предложенный в [512]. В прямых скобках изображено переходное состояние. *Из диссертации [512].*

Структура активного центра RNase A показана на Рис. 9-4 (расшифровка кристаллической структуры активного центра RNase A связанного с циклическим 2'-3' ванадатом уридина, являющегося ингибитором рибонуклеаз). В центре локализованы боковые цепи остатков His12, His199, Lys41, Asp121 и Gln11, а также основная цепь Phe120. Надёжно установлено, что имидазольные группы двух гистидиновых остатков принимают непосредственное участие в катализе, [513], а также вносят вклад в связывание фермента с субстратом (одноцепочечной нуклеиновой кислотой), вероятно посредством стэкинга, [512]. Роль Lys41, вероятно, сводится к поддержанию баланса заряда при образовании переходного состояния. Считается, что в переходном состоянии фосфор пятивалентен (фосфоран), а Lys41 образует единичную водородную связь с переходным состоянием, компенсируя избыточный отрицательный заряд. Основная функция остатка Asp121, согласно [513], в том, чтобы поддерживать конформационную стабильность молекулы RNase A. Остаток Gln11 вносит существенный вклад в энергетику комплекса фермент-субстрат. Не вполне ясной остаётся функция остатка Phe120, [513].

Согласно существующим теоретическим представлениям, катализируемая RNase A реакция переэтерификации осуществляется через переходное состояние, в котором три атома, связанные фосфодиэфирной связью – 2'-кислород рибозы, атом фосфора и 5'-кислород следующей рибозы – должны расположиться на одной прямой. Большое значение для понимания механизма катализа имела работа [516], авторы которой расшифровали кристаллическую структуру комплекса, состоящего из несколько видоизменённой молекулы RNase A (т.н. RNase S, обнаруживает аналогичные каталитические свойства, но легче кристаллизуется) и динуклеозидмонофосфата цитидил(2',5')аденозина. Последнее соединение, содержащее фосфодиэфирную связь в сочленении 2'-5', является аналогом природного динуклеотида с обычным сочленением 3'-5', которое не гидролизует ферментом, но связывается с ним в комплекс, имитирующий переходное состояние. Авторами цитируемой работы показано, что в переходном состоянии нуклеотиды по обе стороны отсекаемого фосфата действительно расходятся в стороны с увеличением угла связи O-P-O (который в переходном состоянии должен составить 180°). Кроме того, расшифровка структуры подтвердила взаимодействие двух остатков гистидина и одного лизина с переходным состоянием.

Большинство специалистов полагают, что на стадии переэтерификации His12 выступает в роли каталитического основания, депротонируя 2'-ОН, а His114 – в качестве кислоты Льюиса, протонируя удаляемую 5'-оксо группу. Фосфор в переходном состоянии координируется пятью атомами кислорода в виде трехгранной бипирамиды, соответствующей оксофоран-аниону, чей избыточный отрицательный заряд компенсируется положительным зарядом протонированной аминогруппы остатка Lys41, Рис. 118. Последующий гидролиз циклического 2',3'-фосфата протекает в противоположном направлении, так что His12 и His114 меняются ролями.

Считается, что ванадат-анион является кристаллохимическим аналогом оксофосфорана. По этой причине некоторые ванадаты, имитируя переходное состояние, ингибируют рибонуклеазы, прочно связываясь с активным центром фермента. Структура активного центра молекулы RNase A ингибированного циклическим 2',3'-ванадатом уридина, показанная на Рис. 9-4, позволяет судить о расположении участвующих в катализе групп His12, His114 и Lys41 вокруг фосфата в переходном состоянии.

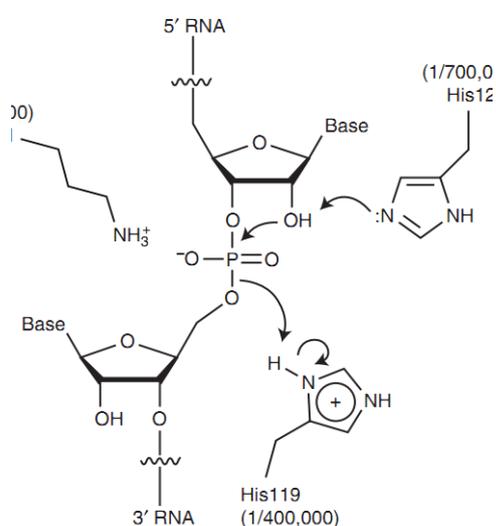


Рис 9-6. Предполагаемый механизм катализа реакции переэтерификации в активном центре фермента RNase A. В скобках указана степень замедления реакции, происходящая от замены соответствующего аминокислотного остатка.
Из обзора [521].

Помимо изложенного выше, было предложено несколько альтернативных механизмов катализа в активном центре RNase A, столь же успешно объясняющих экспериментальные данные, см. например [512,522] и ссылки в [521]. Схема одного из предложенных альтернативных механизмов переэтерификации показана на Рис. 9-5 (b). С практической точки зрения, особый интерес представляет не механизм катализа *per se*, а возможность воспроизвести его, создавая на поверхности основы конфигурации молекул, аналогичные таковым в активном центре фермента. В этой связи наиболее важными представляются экспериментально доказанное участие двух остатков гистидина и протонированной аминогруппы остатка лизина в катализе, а также «распрямлённая» конфигурация двух нуклеотидов, соединяющихся через отсекаемый фосфат, в переходном состоянии. Важно также обратить внимание на высокую концентрацию гидрофобных остатков ароматических аминокислот (His12, His114 и Phe120) в активном центре.

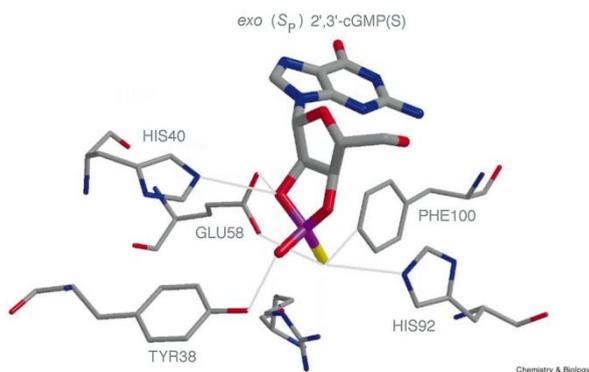


Рис 9-7. Структура активного центра фермента RNase T1 в комплексе с тио-замещённым циклическим 2',3' фосфатом гуанозина. Предполагаемые водородные связи показаны серыми линиями. Атомы азота, кислорода, серы и фосфора показаны, соответственно, голубым, красным, желтым и индигово-синим. Из работы [523].

Повышенная концентрация ароматических аминокислотных остатков в активном центре характерна для многих ферментов, катализирующих реакции с переносом фосфата. Например в активном центре рибонуклеазы RNase T1 присутствуют четыре таких остатка, Рис. 9-7. RNase T1 – это гуанин-специфичный представитель большого семейства рибонуклеаз, филогенетически не связанного с RNase A, катализирующих аналогичные реакции, [512]. Гомологи RNase T1 (т.е. белки, имеющие общего с RNase T1 предка) встречены во всех трех царствах жизни [511]. Сопоставление гуанин-специфичных гомологов показало, что аминокислотный остаток Tyr38 может быть заменён на остаток фенилаланина – другой ароматической аминокислоты. Высказывалось также предположение, что присутствующий в активном центре остаток Phe100 непосредственно не принимает участия ни в катализе, ни в связывании фермента с субстратом. Ароматическая группа этого остатка, вероятно, нужна для поддержания низкого эффективного значения локальной диэлектрической проницаемости среды, усиливающей электростатические взаимодействия в активном центре, [524].

The hairpin ribozyme (рибозимы, содержащие шпилечные структуры) – это небольшие (50 – 100 нуклеотидов) молекулы РНК, извлечённые из генома сателлита т.н. Tobacco Ringspot Virus. *The hairpin ribozyme* селективно катализирует обратимый разрыв фосфодиэфирной связи в подходящей молекуле РНК, при котором на одном конце образуется 5'-ОН, а на другом 2',3'-циклофосфат. Тем самым *the hairpin ribozyme* и RNase A катализируют одну и ту же реакцию переэтерификации, Рис 9-1 (а), с той разницей, что последняя затем катализирует ещё и гидролиз циклофосфата. В природе *the hairpin ribozyme* осуществляет разрез и лигирование РНК в процессе т.н. *rolling circle replication* сателлитной РНК вируса, [525]. Локализация и детальное исследование активного центра *the hairpin ribozyme* как физико-химическими, так и рентгеноструктурными методами выявило неожиданное сходство его с активным центром RNase A, [526-528].

Физико-химические исследования показали, что реакция, катализируемая *the hairpin ribozyme*, протекает без участия ионов двухвалентных металлов, как и у RNase A. Участие двух ионов щелочноземельного металла необходимо для связывания молекулы субстрата с рибозимом, и ион Mg^{2+} является оптимальным для поддержания каталитической активности. Но рибозим функционирует столь же эффективно при замене Mg^{2+} на гексааминкобальта(III), $[Co(NH_3)_6]^{3+}$. Последний представляет собой аналог гидратированного иона Mg^{2+} , который, однако, не может непосредственно координироваться молекулами воды или лигандами молекулы РНК, [529]. Из этого был сделан вывод, что ионы Mg^{2+} играют лишь структурную роль, а катализ осуществляется

лигандами самой РНК, [530]. Биохимические эксперименты позволили идентифицировать четыре нуклеотида, A9, A10, A38 и G8, принимающих непосредственное участие в катализе, [527].

В работе [526] была исследована кристаллическая структура *the hairpin ribozyme*, связанного с ингибитором, имитирующим субстрат. В качестве ингибитора использовалась одноцепочечная молекула РНК, состоящая из 21 нуклеотида, в которой нуклеофильная 2'-ОН группа была заменена на метоксигруппу. Последней замены достаточно для ингибирования реакции разрыва фосфодиэфирной связи. Расшифровка структуры подтвердила отсутствие ионов металла в активном центре. Кроме того, конфигурация молекулы субстрата, части её, расположенной внутри активного центра, оказалась очень похожей на аналогичный отрезок РНК, связанный с активным центром RNase A. Подобно RNase A, активный центр *the hairpin ribozyme* раскручивает и распрямляет спираль РНК по обе стороны от отсекаемого фосфата, так что 2'-ОН в нуклеотиде, предшествующем фосфату, 5'-О в следующем нуклеотиде и атом фосфора оказываются на одной прямой, Рис. 9-8.

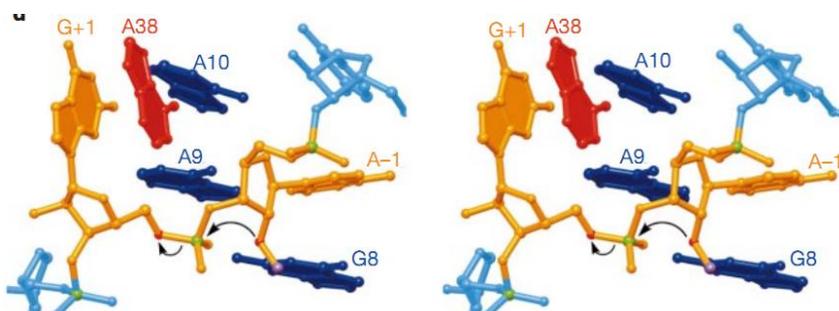


Рис 9-8. Стереоскопическое изображение активного центра в *the hairpin ribozyme*, связанного с ингибитором, имитирующим субстрат. В момент, предшествующий реакции, 2'-ОН в нуклеотиде, предшествующем фосфату, 5'-О в следующем нуклеотиде и атом фосфора располагаются на одной прямой.

Из работы [526].

Феномен раскручивания спирали полинуклеотида в момент, предшествующий рассечению фосфодиэфирной связи представляет значительный интерес, поскольку соответствующая конфигурация нуклеотидов легко может быть воссоздана при стемпинге. Ещё один аспект каталитического механизма, важный для приложений, был выявлен в последовавшей за [526] работе [527] тех же авторов, посвящённой расшифровке кристаллической структуры молекулы *the hairpin ribozyme*, связанной с имитирующим переходное состояние ингибитором. Ингибитор представлял собой молекулу РНК, в которой отсекаемый фосфат был заменён на ванадат. Кроме того, в той же работе была расшифрована структура молекулы рибозима, связанной с неизменённым субстратом. Структура активного центра, связанного с ванадатом, имитирующим фосфат в переходном состоянии, показала, что водородные связи с переходным состоянием образуют три нуклеотида: A9, A38 и G8, Рис 121(В). В то же время, кристалл, состоящий из рибозима в комплексе с неизменённой РНК, как оказалось, содержал два типа активных центров. Поскольку реакция, катализируемая *the hairpin ribozyme*, обратима, карта электронной плотности оказалась суммой изображений активного центра с рассечённой и не рассечённой молекулой субстрата, с преобладанием рассечённой формы, Рис 9-9 (А) и (С). Как видно на Рис. 9-9 (В), ванадат, моделирующий переходное состояние, образует пять водородных связей с пуриновыми основаниями A9, A38 и G8, тогда как для предшествующей рассечению и последующей конформации (показанных на Рис. 9-9 (А) и (С)) число водородных связей с этими основаниями равно, соответственно, двум и трём.

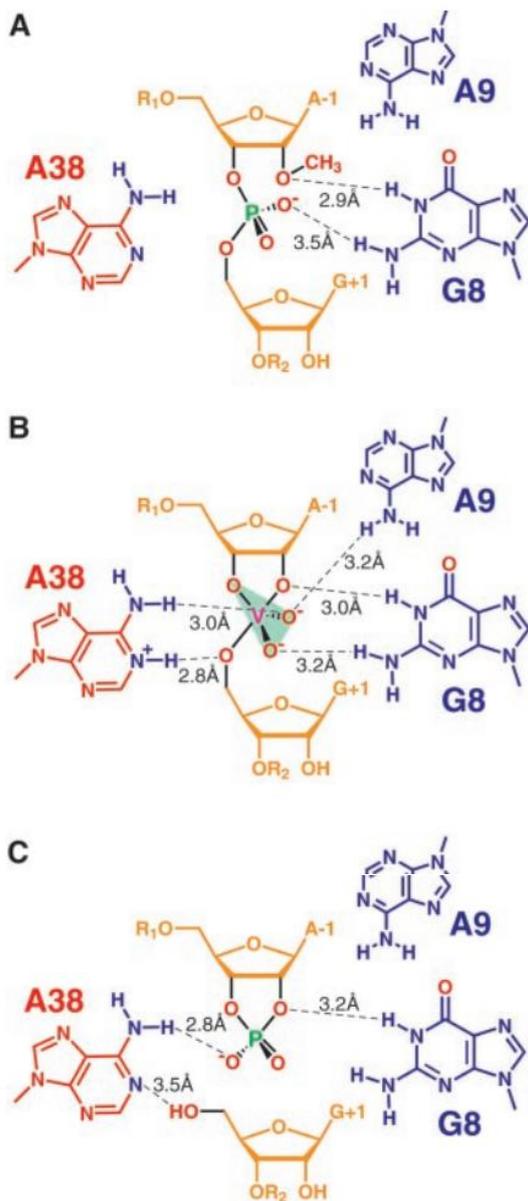


Рис 9-9. Структура водородных связей в активном центре *the hairpin ribozyme*. (А) В состоянии, предшествующем реакции, комплекс стабилизирован двумя водородными связями (пунктир) исходящими от G8. (В) Переходное состояние (имитируемое ванадатом) стабилизируется пятью водородными связями. (С) Продукт реакции стабилизирован тремя водородными связями.

Авторы [526, 527] отмечают, что два из участвующих в катализе пурина – G8 и A39 – расположены в активном центре по обе стороны отсекаемого фосфата, подобно двум остаткам гистидина в активном центре RNase, а третий – A9 локализован как Lys41, Рис. 9-4. Из этого, по аналогии, делается вывод, что G8 и A38 функционируют, соответственно, как кислотный и основной катализаторы, в то время как экзоциклические амины остатков A9 и A38, подобно Lys41 осуществляют электростатическую компенсацию избыточного отрицательного заряда.

Результаты, представляющие особый интерес с точки зрения возможных приложений, были обнаружены при проверке гипотезы авторов [526, 527] о роли остатков G8 и A38 в катализе. В работе [531] исследовался т.н. *abasic hairpin ribozyme*. В молекуле такого рибозима азотистое основание одного из нуклеотидов заменяется атомом водорода. Авторами было обнаружено существенное снижение каталитической активности при удалении азотистое основание нуклеотида G8. Согласно структурным расшифровкам, напомним, этот нуклеотид наиболее интенсивно взаимодействует с переходным состоянием отсекаемого фосфата. Весьма примечательно то, что активность рибозима частично восстанавливается при добавлении в раствор некоторых гетероциклических аминов, таких как цитозин, изоцитозин, 2-амино-пиримидин и 2,6-диаминопурин, вероятно,

потому что добавленные молекулы занимают пустующее место гуанина в молекуле рибозима. Испробовав большое количество соединений, авторы показали, что активность восстанавливается при добавлении молекул, имеющих аналогичное гуанину строение той части молекулы, которая участвует в образовании уотсон-криковской пары. Авторы смогли также показать, что экзоциклический амин необходим для восстановления активности, а атом кислорода кето-группы – нет. (Поскольку 4-пиримидинон, имеющий кето-кислород, соответствующий Об гуанина и не имеющий экзоциклической аминогруппы, активности не восстанавливает, в то время как восстановление активности имеет место при добавлении 2-аминопиридина, который имеет экзоциклическую аминогруппу и не имеет кето-кислорода.)

Кроме того, согласно данным [531], восстановленная активность *hairpin ribozyme* с удалённым основанием нуклеотида G8, интенсифицируется при уменьшении pH. Тем самым протонирование добавляемой молекулы способствует катализу. Наконец, для успешного восстановления каталитической функции добавляемая молекула должна иметь достаточно высокую растворимость в воде. Например, добавление гуанина в раствор не восстанавливает активности, и авторы связывают это с его низкой растворимостью.

В работе [532] тем же коллективом авторов исследована каталитическая активность *abasic hairpin ribozyme*, в котором удалено азотистое основание ещё одного нуклеотида, расположенного в активном центре рибозима – A38. Как и в экспериментах с G8, было зафиксировано значительно падение каталитической активности, частично восстанавливаемое при добавлении в раствор нескольких соединений, являющихся азотистыми основаниями нуклеотидов и их аналогами. Из 36 испробованных соединений, способность к восстановлению каталитической активности рибозима обнаруживают аденин, 3-метиладенин, 2,6-диамнопурин, изоцитозин, и 2-аминопиридин. Из них 2,6-диамнопурин восстанавливает активность наиболее эффективно. Списки веществ, восстанавливающих активность при удалении основания, соответственно, у G8 и у A38, перекрываются, но не совпадают. В частности, цитозин, успешно восстанавливающий активность рибозима с изменённым G8, не оказывает никакого действия на рибозим с модифицированным A38.

Помимо *the hairpin ribozyme*, методика исследования рибозима с удалённым или замещённым основанием применялась при исследовании рибозимов, извлечённых из РНК вируса гепатита D (рибозим HDV), катализирующих ту же реакцию переэтерификации. В процессе катализа отсекаемый фосфат субстрата помещается в глубокую складку рибозима HDV, тем самым он оказывается изолированным от молекул растворителя. В структурных и биохимических исследованиях было выяснено, что остаток цитозина C75 принимает непосредственное участие в катализе, [519]. Замена этого остатка на урацил или гуанин приводит к полной утрате каталитической активности; при замене его на аденин активность сохраняется, но в тысячу раз меньшая. Активность урацил-замещённого рибозима восстанавливается при добавлении цитозина в раствор. Активность также восстанавливается при добавлении в раствор имидазола или 4(5)-метилимидазола. Для поддержания активности модифицированного рибозима во всех случаях требуется присутствие двухвалентного иона – Mg^{2+} , Ca^{2+} или Mn^{2+} , [533]. Удаление азотистого основания C75 (т.е. замещение соответствующего цитозина атомом водорода) тоже сопровождается утратой активности рибозима, которая может быть восстановлена добавлением в раствор имидазолового буфера в комбинации с Mg^{2+} или Ca^{2+} , [534]. В последней работе способность восстанавливать активность рибозима была исследована для большого количества соединений. Все 1-, 2- или 1,2-замещённые аналоги имидазола активности не восстанавливают, тогда как ряд 4-замещённых соединений имидазола (4-метилимдазол, 4-гидроксиимидазол, 3-амино-1,2,4-триазол) обнаруживают такую способность.

Помимо *the hairpin ribozyme* и рибозима HDV, возможность восстановления активности в рибозиме с удалёнными одним или несколькими основаниями из активного центра путём добавления соответствующих оснований в раствор была также продемонстрирована на примере т.н. *the hammerhead ribozyme*, [535].

9.1.2. Центры с двумя ионами металлов.

Своеобразие рассматриваемых в этом разделе биокатализаторов в том, что боковые цепи аминокислот не принимают непосредственного участия в катализе. Реакция переноса фосфата катализируется двумя атомами металла, расстояние между которыми составляет порядка 3.9 Å.

Полимеразы. Активные центры, в которых осуществляется синтез полинуклеотидов, имеет сходное строение для всех известных ДНК и РНК полимераз, [536]. В них всегда присутствуют два иона металла, в норме это ионы Mg^{2+} . Схема, представленная на Рис. 9-10 основана на расшифровке кристаллической структуры полимеразы *pol β* человека.

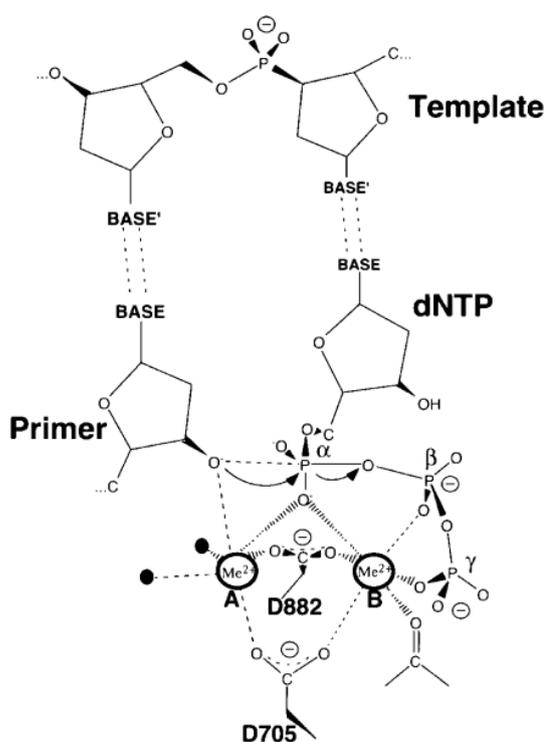


Рис 9-10. Схема активного центра ДНК полимеразы. Номера двух консервативных остатка аспарагиновой кислоты соответствуют их расположению в *E. coli* DNA polymerase I. Два атома металла, обозначенные как А и В, предположительно, стабилизируют переходное состояние атома фосфора, имеющее координационное число 5. Из обзора [237].

Два частично гидратированных иона Mg^{2+} в октаэдрической координации, обозначаемые как А и В, удерживаются в молекуле полимеразы двумя абсолютно консервативными карбоксильными группами. Расстояние между атомами А и В чуть меньше 4 Å, [237]. Ион А взаимодействует с 3'-гидроксильной группой праймера и, предположительно, способствует уменьшению значения константы pK_a гидроксила, а вследствие этого становится возможной атака α -гидроксила присоединяемого дезоксирибонуклеозидтрифосфата. Оба катиона, А и В, предположительно, принимают участие в стабилизации переходного состояния фосфата, с координационным числом 5, возникающим в процессе этой реакции. Затем металл В связывается с β - и γ -фосфатами и, вероятно, способствует их удалению по завершению реакции.

Исследование РНК-полимеразы II методами рентгеновской кристаллографии показало, что атомы А и В по-разному ведут себя в процессе транскрипции: атом А фиксирован, в то время как атом В подвижен и, вероятно, покидает активный центр, когда в нём нет РНК (молекулы субстрата). В состоянии, непосредственно предшествующем образованию

фосфодиэфирной связи, расстояние между этими атомами составляет чуть более 4 Å, по завершении реакции атом В удаляется от атома А на 5.8 Å, [538,539].

Интроны группы I – это рибозимы, имеющие большие размеры, осуществляющие аутосплайсинг и использующие несвязанный (с молекулой рибозима) гуаниловый нуклеотид в качестве кофактора. Рибозимы этого типа имеют широкое распространение; в общей сложности идентифицировано более 2000 нуклеотидных последовательностей, обнаруживающих значительные вариации. Тем не менее, активные центры в интронах группы I устроены идентично, и в них содержится по два иона Mg^{2+} , [540,541].

С химической точки зрения аутосплайсинг представляет собой две последовательные реакции переэтерификации. До появления рентгеноструктурных данных участие по крайней мере двух атомов металла (обозначаемых M_1 и M_2) в катализе аутосплайсинга было показано биохимическими методами. Было найдено, что на первой стадии аутосплайсинга группа 3'-ОН гуанозинового кофактора, который ковалентно не связан с молекулой рибозима, служит нуклеофилом, атакующим отсекаемый фосфат. Установлено также, что на этой стадии один атом металла (M_2) активирует нуклеофил, связываясь с группой 3'-ОН гуанозина, а другой (M_1) стабилизирует отсекаемую группу. На второй стадии атомы M_1 и M_2 меняются ролями, а в качестве кофактора используется другой гуанозин, ковалентно связанный с молекулой рибозима. На обеих стадиях оба атома металла координируют отсекаемый фосфат, [540,541].

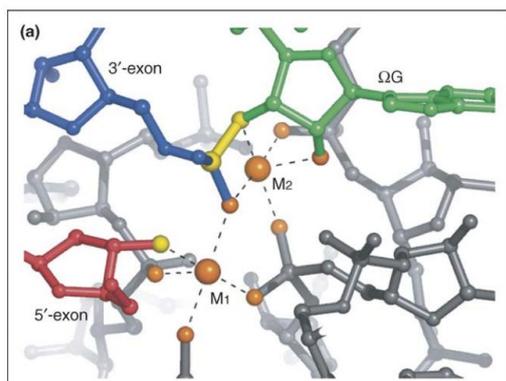


Рис 9-11. Структура активного центра интрона группы I по данным рентгеноструктурного анализа. Ионы Mg^{2+} показаны в виде крупных оранжевых сфер. Из работы [541].

Расшифровка кристаллических структур нескольких модифицированных рибозимов позволила прояснить различные стадии аутосплайсинга. Показанный на Рис. 9-11 активный центр интронов типа I находится в состоянии непосредственно предшествующем второй стадии аутосплайсинга. Активный центр локализован в складке, образованной изгибом молекулы интрона. При этом большое количество фосфатных групп локализуется вблизи каталитического центра. Аккумулируемый отрицательный заряд компенсируется несколькими ионами металла, два из которых принимают непосредственное участие в катализе (эти два атома металла и являются упоминавшимися ранее M_1 и M_2 , найденными биохимическими методами *in vitro*). Расстояние между центрами ионов оказалось равным 3.9 Å, что совпадает с аналогичным расстоянием во всех изученных ДНК- и РНК-полимеразах. При этом было найдено, что оба металла обнаруживаются в активном центре, и координирующие их лиганды совпадают с таковыми, установленными *in vitro*, только если активный центр содержит отсекаемый фосфат. В отсутствие субстрата в центре обнаруживается лишь один атом металла. В переходном состоянии, показанном на Рис. 9-11, (как на первой стадии аутосплайсинга, так и на второй) оба металла координируют отсекаемый фосфат, опять-таки в согласии с данными, полученными ранее биохимическими методами, [540,541]. Межатомное

расстояние P – Mg в момент, непосредственно предшествующий расщеплению фосфата, составляет $\sim 2.5 \text{ \AA}$, что близко к расстоянию между атомом P и ближайшим к нему Ca в структуре апатита. Предполагаемая схема катализа реакции расщепления фосфодиэфирной связи в активном центре интрона группы I показана на Рис. 9-12.

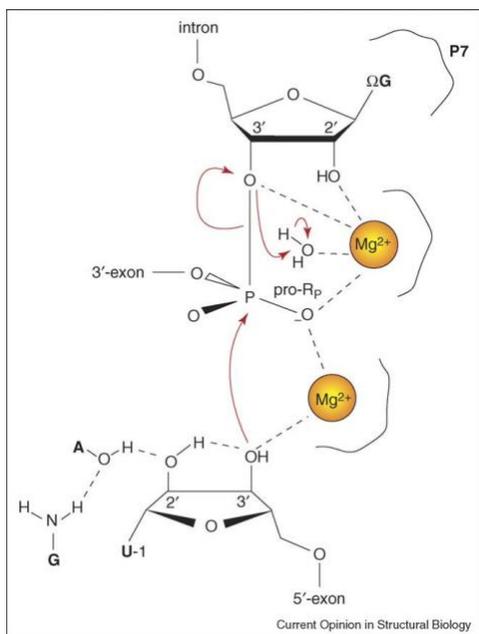


Рис 9-12. Предполагаемый механизм лигирования экзона интроном группы I на втором этапе аутосплайсинга, в котором металлогидрат протонирует отсекаемую группу ОЗ' нуклеотида ΩG .
Из работы [541].

Интроны группы II, ещё один класс интронов, осуществляющих аутосплайсинг, был детально исследован в последние годы. Рибозимы этого класса способны осуществлять как реакции гидролиза РНК, так и переэтерификации. Описание последовательных стадий процессов, катализируемых интронами группы II, полученные на основании биохимических данных и расшифровки семнадцати кристаллических структур, можно найти в работах [542] и [543]. Описания эти достаточно сложны, и едва ли имеет смысл их здесь воспроизводить. В активном центре обнаружено четыре атома металла, два из которых, являющиеся ионами Mg^{2+} , принимают непосредственное участие в расщеплении фосфата. В переходном состоянии атом P отсекаемого фосфата расположен посередине между двумя атомами металла, на удалении $\sim 2 \text{ \AA}$ от каждого из них. В качестве атакующего нуклеофила используется молекула воды или группа 2'-ОН аденозина, ковалентно связанного с молекулой рибозима.

9.1.3. Центры с двумя ионами металлов и имидазольными группами.

Активные центры большого количества ферментов и рибозимов одновременно содержат два иона металла и лиганды с имидазольными кольцами, поэтому в некотором смысле каталитические центры из этой группы можно считать комбинацией двух предшествующих. Здесь обсуждается лишь несколько примеров таких активных центров, принадлежащих ферментам из хорошо изученного семейства биметаллических гидролаз. Ряд авторов называют этот класс ферментов *hydrolytic multinuclear metalloenzymes*, потому что в активных центрах некоторых из них обнаруживаются не два, а три атома металла.

Purple acid phosphatases (PAPs) представляет собой семейство фосфомоноэстераз широкой специфичности, активных в кислой или нейтральной среде. Известные представители этого семейства имеют растительное или животное происхождение. Активные центры в молекулах PAP из разных организмов состоят из идентичных аминокислот, хотя в целом аминокислотные последовательности ферментов из удалённых

видов обнаруживают мало сходства. PАР – это единственный среди биметаллических гидролаз фермент с гетеровалентным центром, для которого доказана необходимость гетеровалентности для каталитической активности. В PАР растений обнаруживаются центры $Fe^{3+} - M^{2+}$, где M – это Zn или Mn . Молекулы PАР млекопитающих содержат центры с $Fe^{3+} - Fe^{2+}$, однако их каталитические свойства не изменяется при замене двухвалентного катиона на Zn^{2+} с образованием центра $Fe^{3+} - Zn^{2+}$, [545]. Согласно данным, помещённым в обзор [546], активность комплекса сохраняется *in vitro* при замене Fe^{3+} на Ga^{3+} или Al^{3+} . Кроме того Fe^{3+} может быть заменён на Mn^{2+} с образованием центра $Mn^{2+} - Mn^{2+}$, проявляющего наибольшую активность в щелочной среде.

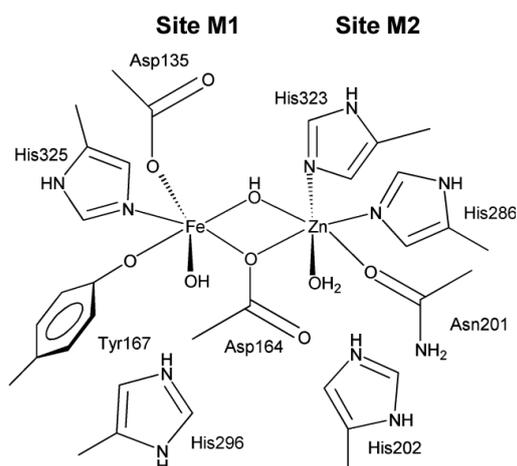


Рис 9-13. Схема строения активного центра фермента *Purple acid phosphatase*. Семь аминокислотных остатков, координирующих атомы металлов, и два гистидина (His 202, His 206) идентичны в образцах *Purple acid phosphatase* из филогенетически удалённых видов.

Ион Fe^{3+} в PАРs координируется кислородом депротонированного тирозина, азотом гистидина и кислородами двух остатков аспарагиновой кислоты, один из которых образует мостиковое соединение двух атомов металла, Рис. 9-13. Двухвалентный ион M^{2+} координируется кислородом образующего мостик остатка аспарагиновой кислоты, атомами азота двух остатков гистидина и одним кислородом аспарагина. Имеются данные, указывающие на присутствие гидроксил-ионов в координационной сфере обоих металлов, а также на присутствие молекулы H_2O в качестве лиганда при Zn^{2+} . В спектроскопических и кинетических экспериментах было выяснено, что число молекул воды, присутствующих в качестве лигандов, для какой-либо фиксированной молекулы PАР может меняться в зависимости от субстрата, присутствующего в центре двухвалентного иона металла, а также pH среды, [546]. Отсекаемый фосфат представлен протонированной формой $H_2PO_4^-$. Межатомное расстояние $Fe^{3+} - M^{2+}$, измеренное для разных PАРs, колеблется в узких пределах. По данным рентгеновской кристаллографии, для PАР из красной фасоли расстояние $Fe^{3+} - Zn^{2+}$ составляет 3.1 – 3.3 Å, в PАР из сладкого картофеля расстояние $Fe^{3+} - Mn^{2+}$ равно 3.3 Å, в PАР млекопитающих расстояние $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ составляет 3.1 – 3.5 Å. Аналогичное значение получено методом спектроскопии EXAFS для Zn-замещённой PАР свиньи: 3.2 – 3.3 Å, [545]. PАР ингибируется некоторыми простыми анионами, такими как фторид (F^-), а также оксианионами – молибдатом (MoO_4^{2-}), фосфатом ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) ванадатом ($H_2VO_4^-$) и вольфраматом (HWO_4^-), [546].

На Рис. 9-14 показан вероятный механизм гидролиза фосфата, катализируемого молекулой PАР, который был предложен в результате большого количества структурных, кинетических и биохимических исследований этого процесса, в том числе с учётом изотопных эффектов, а также с использованием изотопных меток и искусственных

мутаций, [545,547, 546]. Гидролиз протекает в восемь стадий, обозначенных буквами **a** – **e**. Обращает на себя внимание сходство взаимной ориентировки фосфата и двух металлов в состояниях **c**, **d** и **e** с взаимной конфигурацией фосфата и двух атомов металла в апатите. Расстояние между атомами металла (3.1 – 3.3 Å,) очень близко к величине $c/2$ апатита, в особенности если это апатит с высоким содержанием катионов малого ионного радиуса, таких как Cd^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} , см. выше, раздел 7.2. На расстояние равное $c/2$, напомним, разнесены два ближайших атома металла вдоль оси z в структуре апатита.

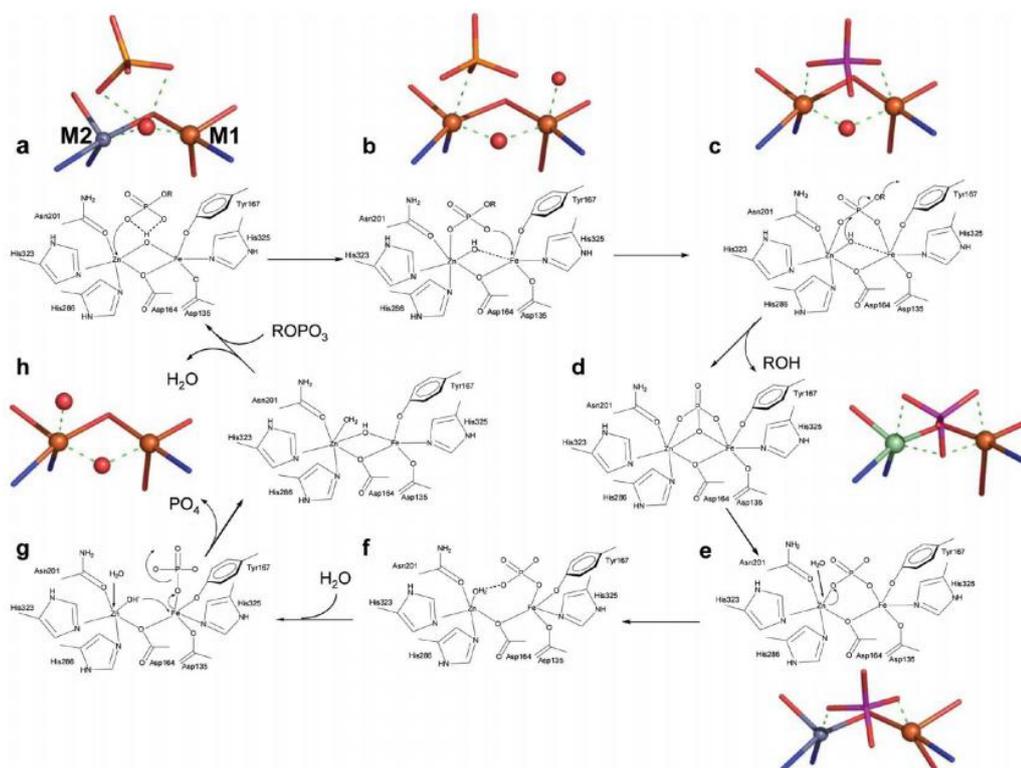


FIGURE 3. Proposed reaction mechanism for PAP-catalyzed hydrolysis. PAP and the substrate interact to form a precatalytic complex; subsequently, the substrate is rearranged to coordinate directly to at least one of the metal ions in the active site (a–c). Nucleophilic attack by either the μ -hydroxide (as shown) or a noncoordinating hydroxide in the second coordination sphere is followed by the release of the leaving group, and the active site is returned to its resting state by the exchange of the bound phosphate group by two water molecules (d–h). Where available crystallographic snapshots (stick models) of relevant active site structures are also shown. ¹⁰ (a) red kidney bean PAP–sulfate complex; (b) rat PAP–sulfate complex; (c) pig PAP–phosphate complex; (d) sweet potato PAP–phosphate complex, (e) red kidney bean PAP–phosphate complex, and (h) red kidney bean PAP. Adapted with permission from ref 18.

Рис 9-14. Предполагаемый механизм гидролиза фосфата ферментом PAP.

Из обзора [546].

Щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase, AP) – наиболее детально исследованный представитель биметаллических гидролаз, отщепляет фосфат от многих типов молекул, таких как нуклеотиды, белки, алкалоиды, неорганический пирофосфат. Помимо гидролиза с выделением свободного фосфат-аниона, осуществляет также перенос фосфата с образованием фосфорилированных спиртов при наличии спиртов в растворе. Наиболее активна в щелочной среде. Присутствует в организмах эукариотов и прокариотов.

Каталитический центр AP из *E. coli* содержит два иона Zn^{2+} и один Mg^{2+} , Рис. 9-15. Атом Zn1 координируется пятивершинником, состоящим из His331, His412, двух атомов кислорода карбоксильных групп Asp327 и одним кислородом фосфата. Атом в позиции Zn2 имеет тетраэдрическую координацию, слагаемую атомом азота His370, двумя монодентатно подсоединёнными кислородами карбоксильных групп Asp 51и Asp369, а также другим атомом кислорода фосфатной группы. Тем самым фосфат-анион образует бидентатное мостиковое соединение двух атомов металла (как уже отмечалось выше, аналогичное соединение имеется в структуре апатита). В активном центре было обнаружено несколько молекул воды, но ни одна из них не координирует Zn1 или Zn2.

Расстояние Zn1–Zn2 равно 4.1 Å, а расстояния Zn2–Mg3 и Zn1–Mg3 составляют, соответственно 4.8 Å и 7.1 Å, [547].

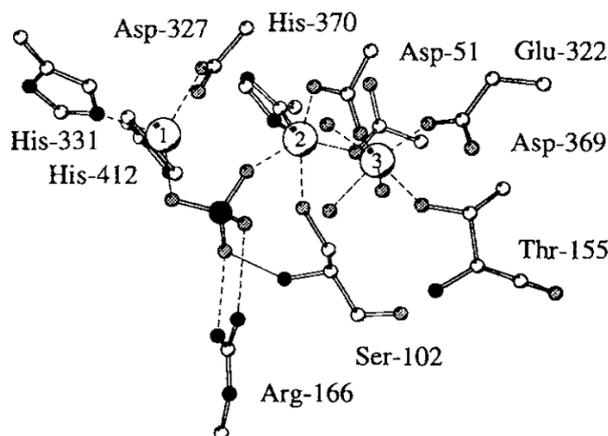


Рис 9-15. Кристаллическая структура активного центра щелочной фосфатазы из *E. coli* с координируемым фосфатом, стабилизированным водородными связями с остатком аминокислоты аргинина. Из обзора [547].

Замена ионов цинка в позициях 1 и 2 на Mg^{2+} , Co^{2+} или Mn^{2+} сопровождается значительным уменьшением активности. Замена Zn^{2+} на Cd^{2+} радикальным образом снижает скорость дефосфорилирования. Замены Mg^{2+} в позиции 3 бактериальных АР лишь незначительно сказываются на активности фермента, однако наличие магния необходимо для поддержания каталитической активности АР млекопитающих. Считается, что атомы Zn1 и Zn2 принимают непосредственное участие в катализе, а Mg3 играет главным образом структурную роль, [547,548].

Нуклеаза P1 (Nuclease P1) – гликопротеин, извлечённый из грибка *Penicillium citrinum*, представитель цинк-зависимых нуклеаз, расщепляющих одноцепочечные РНК и ДНК на нуклеотиды, способен также расщеплять двухцепочечные нуклеиновые кислоты. Фермент представляет собой фосфодиэстеразу, расщепляющую связь между 3'-гидроксилом и 5'-фосфатом двух последовательно расположенных нуклеотидов. В то же время фермент обладает активностью фосфомоноэстеразы, т.е. обладает способностью удалять концевой 3'-фосфат, [549].

Активный центр нуклеазы P1 содержит три атома Zn. Расстояние между центрами атомов Zn1 и Zn3 составляет ~3.2 Å. Третий атом цинка (Zn2) отстоит на ~5.8 Å от Zn1 и на ~4.7 Å от Zn3. Два атома цинка, Zn1 и Zn3, соединены мостиком из остатка аспарагиновой кислоты и молекулой воды (или гидроксилом). В дополнение к мостиковым лигандам, Zn1 координируется двумя остатками гистидина и одним аспарагиновой кислоты. Атом Zn3 дополнительно координируется одним гистидином, а также азотом и кислородом N-конца триптофана. Наконец, атом Zn2 координируется двумя гистидинами, одним остатком аспарагиновой кислоты и двумя молекулами воды. Тем самым, каждый из трёх атомов цинка координируется пятью атомами, два из которых – азоты и три – кислороды, Рис. 9-16.

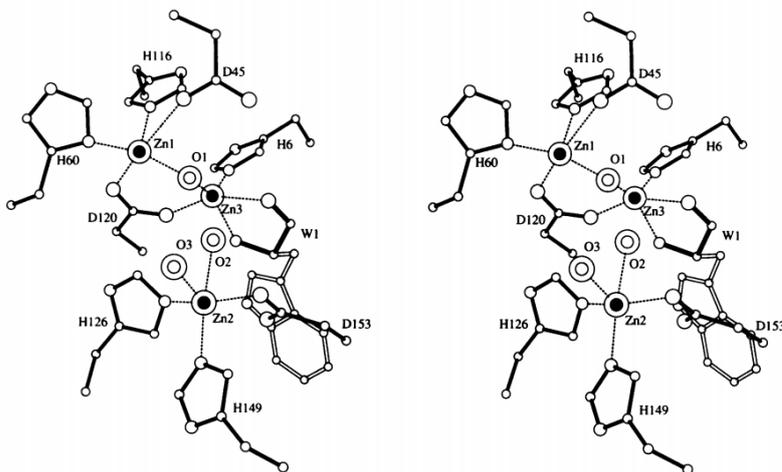


Рис 9-16. Стереограмма активного центра нуклеазы P1. Атомы углерода, азота и кислорода показаны незалитыми кружками, диаметр которых определяется типом атома. Ионы цинка (Zn1, Zn2, Zn3) и молекулы вода (O1, O2, O3) показаны как концентрические сферы. Пунктиром показаны взаимодействия Zn – лиганд. *Из работы [549].*

3'-5' экзонуклеазы – ферменты, катализирующие отщепление мононуклеотидов от 3'-конца одноцепочечного полинуклеотида путём гидролиза фосфодиэфирной связи. 3'-5' экзонуклеазы ДНК полимераз способны также расщеплять фосфодиэфирную связь в двухцепочечных полинуклеотидах. Здесь речь идёт только о центрах активности 3'-5' экзонуклеазы, входящих в состав ДНК полимераз как часть системы, обеспечивающей исправление ошибок репликации, т.н. *proofreading*. (ДНК полимеразы – это многофункциональный фермент с активностью полимеразы, 3'-5' экзонуклеазы и 5' 3' экзонуклеазы; соответствующие центры локализованы в различных доменах молекулы.)

Для поддержания каталитической активности 3'-5' экзонуклеаз необходимо присутствие двухвалентных ионов, Mg^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} , однако остаётся неизвестным, который из них предпочтителен *in vivo*. Большая часть 3'-5' экзонуклеаз наиболее активны в щелочной среде, оптимальные значения pH варьируют от 7.5 до 10.2. Активность обнаруживают лишь центры, содержащие два иона металла, [545].

К настоящему времени изучена структура большого числа 3'-5' экзонуклеаз. Их активные центры имеют сходное строение, хотя общая степень гомологичности молекул невелика; совпадения не превышают 20%. Центр содержит четыре карбоксильные группы и боковую цепь гистидина или тирозина. Последняя не является лигандом, но играет важную роль в катализе, Рис. 9-17. Расстояние между атомами металла составляет 3.7 – 3.9 Å. В обзоре [545] цитируются работы, в которых обнаружено, что конфигурация активного центра 3'-5' экзонуклеазы, наличие/отсутствие в нём молекул воды, положение расщепляемого фосфата и характер взаимодействия его с боковой цепью гистидина меняются при изменении pH среды.

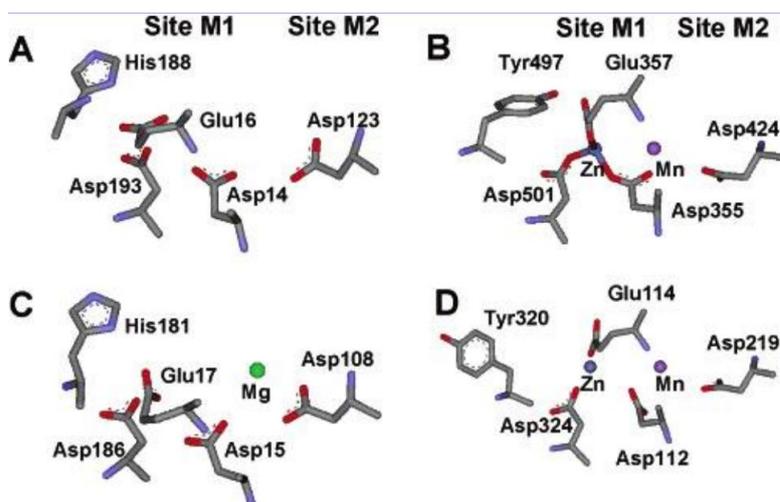


Рис 9-17. Структура активного центра домена 3'-5' экзонуклеазы нескольких ДНК полимераз. (A) Human TREX2; (B) DNA Pol I; (C) *E. coli*; (D) экзонуклеаза ДНК полимеразы бактериофага Т4. Каждый из изображенных активных центров содержит два атома металла. Отсутствие атомов металла в структуре (A) и наличие только одного такого атома в структуре (C) есть следствие специфических условий кристаллизации соответствующей полимеразы. *Из обзора [545].*

Фосфотриэстераза. Выше уже было сказано об отсутствии биогенных триэфиров фосфорной кислоты. Некоторые из соединений этой группы, будучи высокотоксичными, используются в качестве пестицидов и фунгицидов. Устойчивость ряда насекомых, а также живущих в почве бактерий к пестицидам привела к открытию триэстеразы, фермента с высокой эффективностью катализирующего гидролиз триэфиров фосфорной кислоты, но не способного катализировать расщепление ди- и моноэфиров. Широкую известность фермент приобрёл благодаря своей способности катализировать гидролиз нервнопаралитических газов, таких как зарин и зоман. Наиболее изучена фосфотриэстераза из живущей в почве бактерии *Pseudomonas diminuta*, способная также расщеплять связи P–O, P–F, P–CN и P–S, [547].

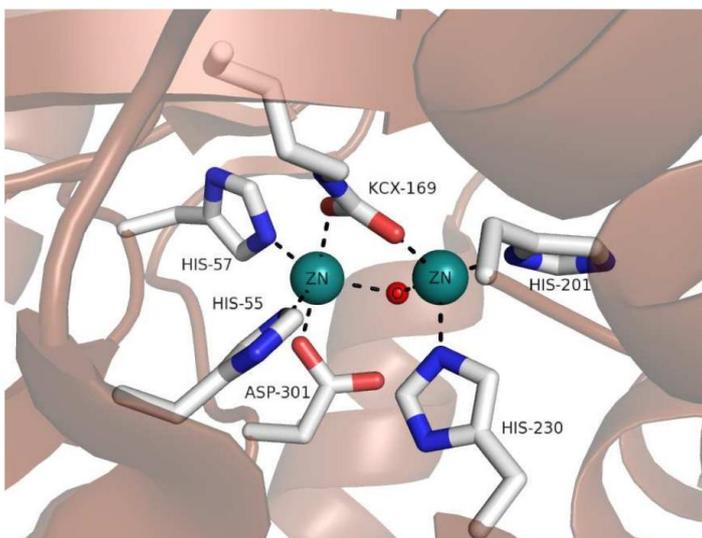


Рис 9-18. Структура активного центра триэстеразы из *Pseudomonas diminuta*. *Из диссертации [548].*

Как показано на Рис. 9-18, активный центр содержит два иона Zn^{2+} , связанных через карбоксилированный остаток лизина (обозначенный на рисунке как KCX-169) и гидроксил-ион. Кроме того Zn1 координирован двумя остатками гистидина и одним остатком аспарагиновой кислоты, а Zn2 – двумя гистидинами и одной молекулой воды. Структура активного центра фосфотриэстеразы сходна со структурой центра в PAF.

Единственное отличие в том, что в последней один гистидин заменён на тирозин, [546]. *In vivo* оба иона металла в активном центре представлены цинком, однако замена их на Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} или Mn^{2+} не приводит к существенному изменению активности. Расстояние Cd–Cd (в Cd-замещённом ферменте) составляет 3.8 Å, [547]. Интересно отметить, что фермент утрачивает активность в кислой среде. Авторы [550], исследовав спектры ЭПР Mn-замещённого фермента при разных значениях pH, смогли показать, что ингибирование фосфотриэстеразы происходит вследствие протонирования гидроксильного мостика, соединяющего два иона металла.

Исследования каталитического механизма энзимологическими, структурными и спектроскопическими методиками показало, что фермент задействует различные стратегии в зависимости от состава иона металла, pH среды и, возможно, субстрата. Подробное их обсуждение имеется в [546].

Закономерности строения биметаллических гидролаз. В результате детального исследования большого количества ферментов данного класса, содержащего, помимо обсуждавшихся выше, ряд и других, катализирующих гидролиз амидов и эфиров фосфорной кислоты, были выявлены закономерности строения их активных центров, общие для всего класса. При сопоставлении атомных конфигураций типичных центров (в активном состоянии) обнаруживается сходство их с конфигурациями, которые должны возникать на поверхности погружённых в раствор апатитовых кристаллов. Указанная аналогия, вероятно, даёт представление о том, как осуществлялся катализ реакций переноса фосфата до возникновения рибозимов и ферментов. Эта же аналогия подсказывает и один из путей каталитического образования фосфодиэфирных связей при абиогенной полимеризации нуклеотидов.

Для всех биметаллических гидролаз характерно присутствие двух (и более) ионов металла в активном центре. Кроме того, ферменты этой группы обнаруживают сходство строения координационной сферы ионов. В качестве лигандов наиболее распространены имидазольные группы боковых цепей аминокислот, за ними следуют кислотные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Ещё в качестве характерного хотя и менее распространённого лиганда упоминается тирозин, [546]. Подмечено, что в гомологичных ферментах координирующий гистидин иногда может быть заменён на тирозин, как в случае 3'-5' экзонуклеазы ДНК полимераз, Рис. 9-17 (B и D). Замена гистидина на тирозин наблюдается также для некоторых гомологически не связанных ферментов со сходным строением активных центров, таких как обсуждавшиеся выше PAPs и фосфотриэстеразы.

Некоторые представители обсуждаемого класса ферментов, такие как Ni-зависимая уреаза, используют лишь один тип катионов, но подавляющее большинство допускают ряд замещений. Кроме того биметаллические гидролазы обычно обнаруживают способность катализировать не одну, а несколько реакций. Последняя особенность получила название *substrate promiscuity*.

Важные для практических применений особенности биметаллических гидролаз были выявлены при установлении числа атомов металла в их активных центрах. Длительное время в литературе фигурировали противоречивые сведения о количестве атомов металла в активном центре той или иной гидролазы, их координации и о расстоянии между ними. Углублённые исследования, выполненные в попытках разъяснения указанных противоречий, показало, что в действительности взаимное расположение атомов в центре меняется в присутствии субстрата, [551].

Современные представления об устройстве активных центров в значительной мере опираются на данные рентгеноструктурного анализа. Для получения кристаллов необходимо предотвратить (катализируемое ферментом) расщепление фосфата, и этого можно добиться тремя способами: можно изготовить кристаллы фермента в отсутствие субстрата. Можно также приготовить кристаллы фермента, связанного с видоизменённым

субстратом, ингибирующим расщепление фосфата. Можно, наконец, заменить катионы в активном центре на другие, не поддерживающие катализ.

Реализация первой возможности показала, что в отсутствие субстрата могут быть получены кристаллы с различным содержанием катионов в активном центре. Отсекаемый фосфат субстрата взаимодействует с катионами активного центра, и по этой причине присутствие субстрата часто оказывается одним из условий присутствия всех катионов в центре. Примером такого поведения, согласно авторам [551], может служить RNase H – рибонуклеаза, рассекающая связь 3'-О-Р в РНК, находящейся в виде гетеродуплекса ДНК/РНК. Расшифровка структуры RNase H в виде комплекса с гибридом ДНК/РНК показала наличие двух ионов Mg^{2+} в активном центре при концентрации магния в растворе ниже 2.5 mM. В отсутствие субстрата эти ионы обнаруживались в тех же позициях, но при значительно более высоких концентрациях магния в растворе, несовместимых с физиологическими условиями. Последнее и не удивительно, так как отсекаемый фосфат в структуре комплекса фермент/субстрат составляет три лиганда для ионов Mg^{2+} . Тем самым фосфат субстрата и катионы Mg^{2+} в активном центре взаимно обусловлены. В присутствии фосфата ионы магния размещаются в активном центре, а в присутствии этих катионов фосфат энергичнее взаимодействует с активным центром фермента.

Далее, использование второго пути, когда исследуются активные центры ферментов, связанных с субстратом, в которых расщепление фосфата ингибировано тем или иным способом, показало необычайно высокую чувствительность катионов металла, как в отношении числа, так и их локализации в центре, к небольшим изменениям в структуре субстрата. Сходные явления описаны и для некоторых полимераз. Удаление группы 3'-ОН в цепи праймера, обычно используемое для получения комплексов полимеразы с субстратом, приводит к смещению иона металла в позиции А на $\sim 1 \text{ \AA}$ (см. Рис. 9-10). При этом смещения катионов не обязательно являются артефактом. В случае, когда ингибитор, заменяющий отсекаемый фосфат, достаточно близко имитирует то или иное переходное состояние, изменения в положениях катионов отражают реальные их перемещения в процессе катализа. Сопоставление структурных данных для гидролаз с модифицированными активными центрами с их активностью привело авторов [551] к выводу, что в состоянии покоя два атома металла в активном центре биметаллических гидролаз и полимераз разнесены на $\sim 4 \text{ \AA}$. В этой конфигурации центр не проявляет каталитической активности. Для осуществления катализа эти атомы должны сблизиться до $\sim 3.5 \text{ \AA}$. В некоторых активных центрах расстояние между катионами может быть меньшим. Указанное расстояние соответствует центру $Mg^{2+}-Mg^{2+}$. При замене Mg^{2+} на Mn^{2+} катализ возможен при несколько больших расстояниях.

Наконец, при использовании третьей возможности – катионных замен – выяснилось, что активности биметаллических гидролаз зависят от ионного радиуса катионов. Подавляющее число ферментов обсуждаемого класса содержит ионы Mg^{2+} в активном центре. Замена их на Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , или Mn^{2+} не приводит к утрате каталитической активности. В то же время замена Mg^{2+} на Ca^{2+} , не препятствуя связыванию фермента с субстратом, блокирует катализируемую реакцию. Сопоставление структуры центров, выполненное авторами [551], не выявило существенных отличий в координации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} . Неспособность последнего к поддержанию катализа авторы объясняют невозможностью приведения двух ионов Ca^{2+} на достаточно близкое расстояние. Авторы отмечают, что в кристаллах межатомное расстояние $Ca^{2+}-Ca^{2+}$ никогда не бывает меньше 3.8 \AA (речь, по всей видимости, идёт о кристаллах органических соединений и солей). В отличие от кальция, для ионов Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , или Mn^{2+} соответствующие расстояния часто оказываются менее 3 \AA . По этой причине, полагают авторы, замещение магния на эти ионы в активном центре фермента не приводит к утрате им каталитической активности.

Выше уже отмечалось сходство атомной конфигурации в активных центрах биметаллических гидролаз с определёнными фрагментами структуры апатита. Когда рассекаемая фосфатная группа помещается между двух катионов, расстояние металл – металл оказывается близким к половине параметра c , (на такое расстояние разнесены два ближайших катиона вдоль оси z в апатите), а расстояние металл – фосфор в активном центре оказывается близким к аналогичному расстоянию в апатите. В свете этой аналогии представляется знаменательным тот факт, что Ca^{2+} не поддерживает каталитической активности, а поддерживающие активность катионы Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} и Mn^{2+} все имеют ионный радиус меньше чем у Ca^{2+} . Выше (раздел 7.2) указывалось, что частичное или полное замещение катионов Ca^{2+} в апатите, используемом в качестве основы, на катионы меньшего ионного радиуса может понадобиться для выполнения принципа геометрического соответствия – равенства расстояния между двумя соседними тетраэдрами PO_4 расстоянию между двумя фосфатными группами в В-ДНК. Тем самым, указанные замещения в катионной подрешётке апатита могут служить двум целям одновременно.

Помимо сходства активного центра с фрагментом апатитовой структуры, есть и различия. В апатите имеется два типа катионных позиций Ca1 и Ca2 с координационными числами, соответственно, девять и семь. Катионы в активных центрах биметаллических гидролаз имеют существенно меньшие координационные числа – от четырёх до шести. Очевидно, малые значения координационных чисел могут иметь место для катионов, расположенных не в трёхмерной решётке апатита, бесконечной во всех измерениях, а на поверхности кристалла. Незавершённость координационной сферы составляет одну из особенностей атомов, расположенных на поверхности. Атомная конфигурация, подобная в котором Ca^{2+} замещён на катион меньшего ионного радиуса, или на поверхности кальциевого апатита, гидратированный слой которого поглотил из раствора определённое количество таких катионов.

Интересно также отметить сходство поведения активного центра гидролаз при помещении в него фосфатной группы с поведением гидратированного слоя апатита при адсорбции им фосфатных групп нуклеотидов. Напомним (см. главу 6), связывание молекулы с фосфатной (или карбоксильной, фосфонатной) группой с поверхностью апатита сопровождается переходом части кальция из раствора в сорбент. Подобно тому, связывание активного центра гидролазы с фосфатом субстрата приводит к поглощению активным центром ионов магния из раствора.

9.2. Экспериментальное моделирование активных центров.

Исследование активных центров большого количества ферментов и рибозимов, катализирующих реакции переноса фосфата показало, что в них задействованы лишь две основных каталитических стратегии, которые к тому же можно комбинировать. Эти результаты вызвали к жизни попытки симитировать каталитические центры биокатализаторов, используя небольшие молекулы или ионы. На этом пути был достигнут определённый успех, наглядно демонстрирующий принципиальную возможность имитации. Ниже дан краткий обзор работ, посвящённых имитации того или иного аспекта превращений, имеющих место в активных центрах биокатализаторов, главным образом, реакций рассеяния фосфодиэфирных связей, которые могут оказаться полезными при синтезе полинуклеотидов стемпингом апатита.

В качестве модельного объекта при изучении реакций переноса фосфата часто используется реакция рассеяния фосфодиэфирных связей рибонуклеиновых кислот посредством гидролиза или переэтерификации. Поскольку осуществление этих реакций затруднено ввиду необычайной устойчивостью молекул ДНК и РНК, обусловленной высоким отрицательным зарядом, несомым фосфатно-сахарным остовом полинуклеотида,

ингибирующим атаку фосфата нуклеофилом, [544], рассечение фосфодиэфирной связи часто исследуют, используя небольшие молекулы в качестве субстрата. В качестве модели РНК используются небольшие олигомеры, динуклеозидмонофосфаты, такие как ApG (аденилил(3'→5')гуанозин), ApA, UpA (уридил(3'→5')аденозин) и др. Многие авторы в качестве модели РНК также используют соединение HPNPP (2-гидроксипролил-4-нитрофенил фосфат, **1.2** на Рис. 9-19), содержащее нуклеофильную гидроксильную группу, имитирующую группу 2'-ОН молекулы РНК. Сходным образом, соединение BNPP (бис(*p*-нитрофенил фосфат, **1.4** на Рис. 9-19) часто используется в качестве модели ДНК.

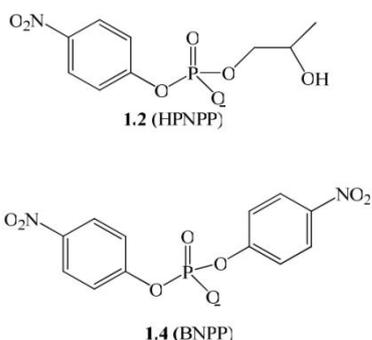


Рис 9-19. Соединения, содержащие фосфодиэфирную связь, часто используемые в качестве модельных субстратов при исследовании гидролиза и переэтерификации РНК (1.2) и ДНК (1.4).

Обсуждаемые работы с некоторой степенью условности могут быть разбиты на две группы. В первую группу вошли исследования прямо или косвенно связанные с моделированием фермента RNase A, а во второй группе работ в роли катализатора выступают ионы металлов и модели биметаллических гидролаз.

9.2.1. Моделирование RNase A и связанные с этим эксперименты.

Как было сказано выше (раздел 9.1.1.), каталитический гидролиз РНК в активном центре рибонуклеазы А осуществляется при непосредственном участии имидазольных групп двух аминокислотных остатков гистидина и аминогруппы остатка лизина. Кроме того, установлено, что фермент RNase A и использующий сходные каталитические стратегии рибозим *the hairpin ribozyme* локально распрямляют и раскручивают спираль полинуклеотида в окрестности рассекаемого фосфата. Сообразно этим результатам, имеются работы, в которых в качестве катализаторов гидролиза полинуклеотидов используется имидазол и его соединения (имитирующие имидазольные группы гистидина) или амины (имитирующие аминогруппу лизина). Феномен раскручивания спирали вызвал к жизни работы, в которых было исследована возможность использования интеркалирующих агентов в качестве катализаторов, а эти работы смыкаются с исследованиями влияния стэкинга на кинетику гидролиза.

Каталитическая активность имидазольного буфера. Участие в катализе, осуществляемого активным центром RNase A, двух остатков гистидина, один из которых протонирован, а другой депротонирован, подсказало авторам [552] идею использовать имидазольный буфер как модель фермента. В указанной работе было показано, что имидазольный буфер действительно ускоряет расщепление фосфодиэфирных связей в полиуридиновой кислоте. Для эффективного катализа необходимо сосуществование протонированной и депротонированной форм молекулы, т.е. имидазола и имидазолия, в растворе.

Впоследствии каталитическое расщепление фосфодиэфирной связи в имидазольном буфере детально изучалось на примере коротких олигомеров, динуклеозидмонофосфатов

(UrU, CpC, ApA), их изомеров в соединении 2'-5' (2',5'- UrU, 2',5'- CpC и 2',5'- ApA), а также HPNPP (1.2 на Рис. 9-19), [552-556]. Для UrU, CpC и ApA реакция исследована во всём диапазоне температуры от физиологической до 240° С. Имидазольный буфер катализирует также реакцию изомеризации с переходом части фосфодиэфирных соединений в конфигурации 3'-5' в конфигурацию 2'-5'. На скорость реакции большое влияние оказывают рН и ионная сила раствора. Метилимидазол, а также L- и D-гистидин катализируют аналогичные реакции. При этом метилимидазол эффективнее имидазола катализирует расщепление и циклизацию фосфата, а L- и D-гистидин менее эффективны. В то же время гистидин эффективнее чем имидазол катализирует изомеризацию.

Гидролиз природной тРНК имидазольным буфером исследован в работе [557]. При высокой температуре (90° С), когда молекула имеет простую линейную структуру, имеет место хаотическое расщепление фосфодиэфирной связи. С понижением температуры, по мере того как молекула сворачивается в уплотнённую глобулу, её расщепление приобретает неслучайный характер. Наибольшую устойчивость обнаруживают фосфодиэфирные связи участков молекулы, закрученных в двойные спирали. Авторы объясняют такое поведение большей гибкостью линейных участков молекулы, позволяющей соседним нуклеотидам принять взаимную ориентацию (*alignment*), необходимую для стабилизации переходного состояния. Скорость гидролиза линейно возрастает с увеличением концентрации имидазольного буфера, достигая достаточных (для практических целей) значений при концентрации буфера выше 1М. Скорость реакции значительно возрастает в присутствии ионов Zn^{2+} и Mg^{2+} , [556,557].

Существенный недостаток имидазольного буфера заключается в его невысокой эффективности. В случае UrU, например, реакция переэтерификации с образованием циклофосфата может быть ускорена лишь в три раза.

Использование аминов в качестве катализаторов гидролиза.

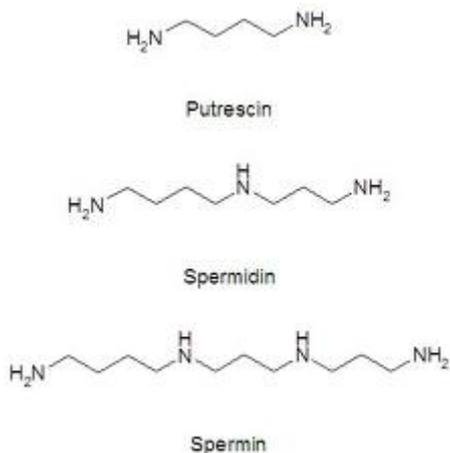


Рис. 9-20. Биогенные полиамины: путресцин, спермидин и спермин.

Наличие лизина в активном центре рибонуклеазы А наводит на мысль о возможности каталитического расщепления РНК в присутствии аминов. Авторами [558] показано, что биогенные полиамины - путресцин, спермидин и спермин, Рис. 9-20, действительно катализируют гидролиз одноцепочечной РНК (в экспериментах использовалась природная тРНК). Каталитический эффект, впрочем, оказался не столь значительным. Более успешным оказался подход к имитации активного центра рибонуклеазы А, в котором в качестве катализатора используются конъюгаты полиаминов и имидазола. Например, конъюгат спермина и имидазола, обозначенный как **Sp-Im** на Рис. 9-21, позволяет полностью разложить РНК за 48 часов при 37 ° С и рН 7, [557]. Однако **Sp-Im** эффективен только в присутствии имидазольного буфера. В работе [559] были найдены

конъюгаты полиаминов и имидазола, эффективно разлагающие РНК в отсутствие свободного имидазола в растворе.

Использование интеркалятов. Роль стэкинга. Имеется ряд исследований гидролитической стабильности фосфодиэфирных связей РНК при физиологических условиях, указывающих на стэкинг, как на взаимодействие препятствующее гидролизу и переэтерификации фосфодиэфирных связей. Гидролитическая стабильность РНК обнаруживает высокую чувствительность к последовательности нуклеотидов, и наибольшей устойчивостью отличаются последовательности с наиболее интенсивным стэкингом, [562-564]. Так, в экспериментах с динуклеозидмонофосфатами наиболее подверженными гидролизу оказываются пары 5'-УрА-3' и 5'-СрА-3'. Предполагается, что стэкинг, способствующий скручиванию молекулы РНК в спираль (как одно-, так и двухцепочечной), препятствует правильному взаимному расположению нуклеотидов, необходимому для возникновения переходного состояния.

По всей видимости, стэкингом обусловлен феномен, обнаруженный в опытах с более длинными олигомерами, заключающийся в том, что устойчивость фосфодиэфирной связи по отношению к переэтерификации определяется не только азотистыми основаниями нуклеотидов, непосредственно примыкающих справа и слева, но и более удалённых соседей. Замена даже одного нуклеотида в олигомере в третьем нуклеотиде справа или слева от рассекаемой фосфодиэфирной связи существенно влияет на её реакционную способность, [562,564]. Скорость переэтерификации встроенного в олигомер участка УрА, например, в зависимости от последовательности более удалённых нуклеотидов, может измениться в сотню раз. Однако указанные различия в устойчивости фосфодиэфирной связи исчезают при повышенной температуре (90° С). Во всех случаях устойчивость связи в двухцепочечных спиральях РНК значительно выше, чем в одноцепочечных.

В работах, посвященных имитации RNase A, использовании интеркалятов показало, что в определённых ситуациях стэкинг становится фактором, способствующим ускорению гидролиза.

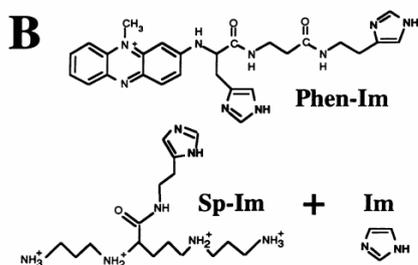


Рис 9-21.

В поисках молекул, способных катализировать гидролиз двухцепочечной РНК, были созданы конъюгаты аминов и (или) имидазола с интеркалирующими агентами, такими как акридин (Рис. 9-22), феназин (Phen-Im на Рис. 9-21) или антрахинон (Рис. 9-23), [557,560,561]. Использование конъюгата гетероциклического соединения, способного соединяться с рассекаемым полинуклеотидом путём образования интеркалята, с аминами и (или) имидазолом, как оказалось, приводит к значительному усилению каталитической активности. Например, соединение глицина и антрахинона, показанное на Рис. 9-23, за один час расщепляет около 60 % рРНК (рН 7.4, 37° С). Стэкинг составляет одно из условий активности для обсуждаемого типа катализаторов. В частности, замена акридина на имидазол в конъюгате, показанном на Рис. 9-22, при сохранении всех остальных функциональных групп молекулы катализатора, приводит к утрате каталитической активности, [560].

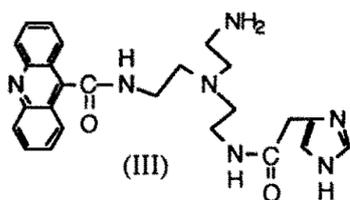


Рис 9-22. Соединение акридина, катализирующее гидролиз РНК. Из работы [560].

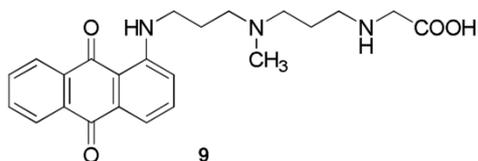


Рис 9-23. Конъюгат глицина и антрахинона, катализирующий гидролиз тРНК. Из работы [561].

Принципиальное отличие экспериментов по определению гидролитической стабильности олигомеров РНК от опытов по каталитическому расщеплению РНК с использованием интеркалятов в том, что в первых стэкинг имеет место непосредственно между азотистыми основаниями примыкающих нуклеотидов, а при использовании конъюгатов азотистые основания взаимодействуют опосредованно, через разделяющие их молекулы интеркалята. По всей видимости стэкинг, в котором азотистые основания соседних нуклеотидов в цепочке РНК непосредственно реагируют друг с другом, препятствует принятию молекулой переходного состояния, а опосредованное взаимодействие, через интеркалят – способствует.

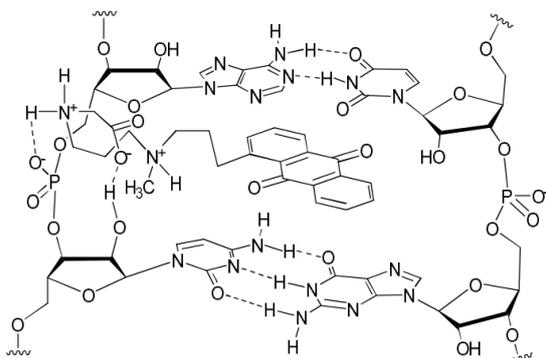


Рис. 9-24. Предполагаемый механизм гидролиза РНК соединением, показанным на Рис. СХХХVI)134. Из работы [561].

Выше, в разделе 9.1.1 отмечалось, что и рибонуклеаза А и *the hairpin ribozyme* раскручивают и распрямляют спираль РНК в непосредственной окрестности отсекаемого фосфата в момент, предшествующий расщеплению. Хорошо известно, что встраивание молекулы интеркалята между азотистыми основаниями соседних нуклеотидов (и удерживаемой за счёт стэкинга) тоже приводит к локальному раскручиванию двойной спирали. Предполагаемый механизм катализа при использовании интеркалятов представлен на Рис. 9-24. Конфигурация, показанная на рисунке, в которой оси удлинения уотсон-криковских пар примерно перпендикулярны оси удлинения раскрученной молекулы полинуклеотида, а интеркалирующий агент удерживается стэкингом между парами азотистых оснований, может быть воспроизведена в процессах стемпинга. Поэтому конъюгаты, подобные показанным на Рис 9-21, 9-22 и 9-23, можно будет использовать для ускорения полимеризации при стемпинге, если более доступные способы катализа окажутся недостаточно эффективными.

9.2.2. Гидролиз фосфодиэфирной связи в присутствии ионов металлов и их комплексов. Моделирование биметаллических гидролаз.

Способность ионов некоторых металлов, присутствующих в виде растворов солей, катализировать переэтерификацию и гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК, РНК и некоторых модельных соединениях активно исследовалась в 1950-1980-х гг. В более современных обзорах авторы подчёркивают, что данные этих работ, как правило, не имеют прямого отношения к катализу, поскольку для протекания реакции ионы металлов должны присутствовать в высоких концентрациях, зачастую многократно превосходящих концентрацию нуклеиновых кислот. Так что речь в данном случае может идти только о *single turnover chemistry*, противопоставляемой *multiple turnover chemistry*, [565]. Ещё одно возражение, более существенное с точки зрения возможных приложений, заключается в том, что в более ранних работах зачастую не было предъявлено доказательств гидролитического характера протекающих реакций. Помимо внутримолекулярной переэтерификации и гидролиза фосфодиэфирных связей, возможна окислительная фрагментация ДНК и РНК с разрывом связи С–О. Гидролитический характер расщепления молекулы может быть установлен надёжной идентификацией её фрагментов, или возможностью воссоздания разорванной молекулы посредством лигирования. В отсутствие таких доказательств не может быть уверенности, что исследуемое фрагментирование ДНК или РНК есть результат гидролитического расщепления фосфодиэфирной связи. В недавнем обзоре [567] приведён список публикаций о гидролитическом расщеплении ДНК комплексами Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} , Mn^{2+} и Co^{3+} , достоверность которых поставлена под сомнение ввиду отсутствия надлежащего исследования продуктов реакции. В то же время, надёжно установлена способность ионов Eu^{3+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Tb^{3+} и Yb^{3+} (присутствующих в растворе в виде хлоридов на уровне 1-10 мМ) катализировать гидролитическое расщепление UpU и ApA , [568]. Ион Ca^{2+} каталитической активности не проявляет, а Mg^{2+} умеренно активен. В случае UpU , Eu^{3+} в 15 раз эффективнее Zn^{2+} , Mg^{2+} в три раза менее эффективен, чем Zn^{2+} , Pb^{2+} эффективнее чем Zn^{2+} . В случае ApA , Eu^{3+} в 50 раз эффективнее Zn^{2+} , а Tb^{3+} и Yb^{3+} несколько эффективнее Eu^{3+} . Способность указанных ионов катализировать переэтерификацию фосфодиэфирной связи значительно возрастает в присутствии имидазола. Гидролитическое разложение ApA , например, ускорено (по сравнению с реакцией в аналогичных условиях в отсутствие катализаторов) в 850 раз для Zn^{2+} при 14 мМ имидазола, в 50000 раз для Eu^{3+} при 80 мМ имидазола, в 60000 раз для Tb^{3+} при 40 мМ имидазола. В работе [569] на примере Zn^{2+} показано наличие кооперативного взаимодействия катиона металла и имидазола при катализе – ускорение разрыва фосфодиэфирной связи в UpU с образованием циклофосфата в присутствии имидазола и Zn^{2+} не может быть объяснено простым суммированием каталитических активностей цинка и имидазола.

Фосфодиэфирная связь в ДНК намного устойчивее к гидролизу, чем в РНК. На сегодняшний день способность свободных ионов металлов в растворе катализировать её гидролиз была продемонстрирована лишь для лантанидов. Каталитический гидролиз аминокислот ионами лантанидов был открыт в середине 1990-х, [570,571]. Ион Ce^{4+} наиболее эффективен как катализатор гидролиза ДНК, а ионы Tm^{3+} , Yb^{3+} и Lu^{3+} (ионы последних трёх элементов в семействе лантанидов) наиболее эффективны при гидролизе РНК. Гидролиз осуществляется в среде геля, состоящего из гидроксида лантанида. Такой гель, например, образуется в растворе соли $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ в концентрации 10мМ при нейтральных значениях рН. Согласно [572,573], при рН 7.6 и 50° С половина фосфодиэфирных связей в динуклеотиде TrT расщепляется в присутствии Ce^{4+} за 3.6 часов; это соответствует ускорению реакции на 11 порядков (против спонтанного расщепления TrT в отсутствие катализатора). Каталитическая активность Ce^{4+} увеличивается на порядок при использовании его в смеси с Pr^{3+} , [574].

При детальном физико-химическом исследовании механизма гидролиза выяснилась ведущая роль комплексов, содержащих два атома металла, в катализе. В случае Ce^{4+} таковым оказался комплекс $[\text{Ce}^{4+}_2(\text{OH})_4]^{4+}$, а в случае Nd^{3+} комплекс имел состав $[\text{Nd}^{3+}_2(\text{OH})_2]^{4+}$, [570].

Рукотворные металлонуклеазы. В современных исследованиях каталитического гидролиза ДНК и РНК центральное место занимает разработка и изучение комплексов металлов с органическими лигандами, иногда называемых рукотворными металлонуклеазами (*artificial metallonucleases*), [565, 575, 576]. Авторы таких работ ставят своей целью создание комплексов, обычно с двумя атомами металла, строением и свойствами напоминающие активные центры биметаллических нуклеаз. Ферменты этого класса, напомним, содержат два иона металла, отстоящие один от другого на 3.3 – 4 Å. В поисках рукотворных гидролаз были опробованы десятки комплексов, содержащих ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Gd^{3+} , Fe^{3+} , лантанидов и других, многие из которых действительно оказались способны катализировать гидролитическое расщепление фосфодиэфирной связи в HPNPP, VNPP, олигомерах РНК и даже в двухцепочечной ДНК. В работе [577], например, обнаружено, что содержащий два иона Fe^{3+} комплекс, показанный на Рис. 9-25, за пять минут расщепляет половину фосфодиэфирных связей в ДНК (при концентрации комплекса 100 мкМ, 37° С, рН 7.0).

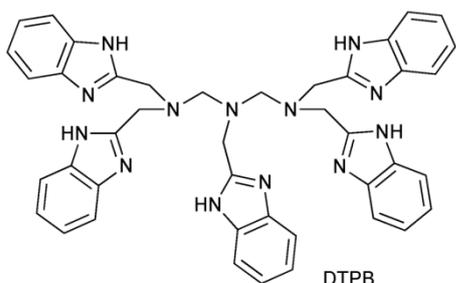


Рис 9-25. Лиганды комплекса с двумя ионами Fe^{3+} , использованного в работе [577].

В поисках рукотворных нуклеаз и исследовании их активности были выявлены некоторые эмпирические закономерности. Показано, например, что комплексы с двумя и более атомами металла эффективнее аналогичных комплексов с одним атомом, однако отличие не столь велико. Например, биметаллический комплекс, показанный на Рис. 9-26 под номером **26**, расщепляет фосфодиэфирную связь в HPNPP, соответственно, в 120 и в 200 быстрее, чем его одноатомные аналоги, показанные на той же диаграмме под номерами **27** и **13**.

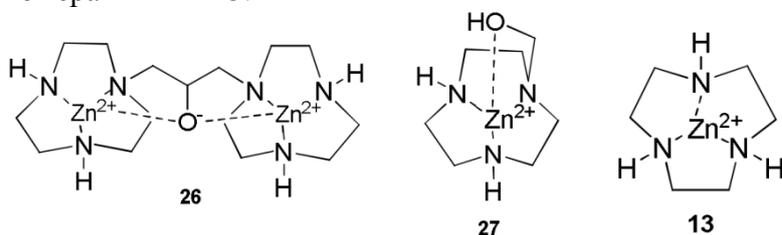


Рис 9-26.

Отмечается также, что координационные числа катионов должны быть минимальными (*unsaturated coordination sphere*) – это требуется для взаимодействия катионов с водой и субстратом. Среди трудностей, с которыми сталкиваются разработчики рукотворных нуклеаз, упоминается необходимость удержания двух высокозарядных одноимённых ионов на близком расстоянии. В этой связи интересно отметить, что два атома металла в решётке апатита расположены на достаточно близком расстоянии, а незавершённость координационной сферы составляет одну из особенностей атома на поверхности

кристалла. Создаётся впечатление, что полимеризация нуклеотидов путём стемпинга апатитовой основы, помимо обсуждавшихся в главе 4 критериев геометрического соответствия, обеспечивающих соблюдение принципа комплементарности при синтезе двухцепочечных полинуклеотидов, создаёт предпосылки и для катализа при соединении нуклеотидов фосфодиэфирными связями. Поскольку Ca^{2+} каталитической активностью не обладает, катионы в апатите (или в его гидратированном слое) должны быть заменены на двух- или трехзарядные катионы, перечисленные выше, такие как Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Gd^{3+} , Fe^{3+} (при этом в качестве основы можно использовать и кальциевый апатит, насыщая каталитически-активным ионом его гидратированный слой).

Влияние растворителя. Существуют указания, что эффективность каталитического расщепления фосфодиэфирной связи может быть повышена при замене воды на аполярный растворитель, таких как низкомолекулярные спирты или ДМСО. Так, согласно данным, приведённым в диссертации [580], двухатомные комплексы цинка, показанные на Рис. 9-27, проявляют лишь умеренную каталитическую активность в воде. При этом их активность лишь незначительно превосходит активность соответствующего одноатомного комплекса, показанного под номером **13** на Рис. 9-28. Однако при использовании в качестве реакционной среды этанола или метанола эти комплексы обнаруживают способность ускорить переэтерификацию фосфодиэфирной связи HPNPP и BNPP (модели, соответственно, РНК и ДНК, Рис 9-19) с образованием циклофосфата в $\sim 10^{12}$ раз. Примечательно, что в этой среде биметаллические комплексы оказываются в 1.5×10^4 раз более активными, чем соответствующий одноатомный аналог. При наличии следовых количеств воды в этаноле (28 mM), гидролиз фосфодиэфирной связи ускоряется более чем в 1.6×10^{17} раз, что сопоставимо с активностью природных фосфодиэстераз.

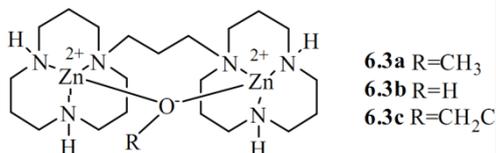


Рис 9-27.

Помимо низкомолекулярных спиртов в качестве реакционной среды могут быть использованы и апротонные растворители в смеси с водой, такие как ДМСО. В работе [581] показано, что замена воды на 80% ДМСО сопровождается значительным усилением каталитической активности гидроокисей трехвалентных лантанидов. Скорость реакции расщепления фосфодиэфирной связи возрастает в 10^{12} - 10^{13} раз для BNPP и в 10^{10} раз для HPNPP. Кроме того, использование 80% водного раствора ДМСО вместо воды позволяет использовать сильные основания, как амидины, гуанидины и алифатические амины для катализа реакции переэтерификации фосфодиэфирной связи, [582]. В водном растворе эти катализаторы не могут быть использованы, т.к. это привело бы к очень высоким значениям pH.

9.3. Обсуждение.

Сопоставление деталей строения активных центров ферментов, катализирующих реакции с переносом фосфата, приводит к выводу о сходстве задействованных в них каталитических механизмов. При всём разнообразии и вариативности частей молекул (ферментов и рибозимов) удаленных от активного центра, очевидно возникших как приспособление для тонкой настройки механизмов индивидуального распознавания

разнообразных субстратов и связывания с ними, в самих центрах задействованы лишь две стратегии катализа. Первая стратегия, заключающаяся в использовании имидазольных групп, задействована в биокатализаторах, обсуждаемых в разделе 9.1.1. Вторая стратегия, основанная на особых свойствах активного центра, состоящего из пары двух- или трёхвалентных катионов, помещённых на близкое расстояние, обсуждается в разделе 9.1.2. Детали строения центров, обсуждаемые в следующем за ними разделе 9.1.3, свидетельствуют о возможности комбинирования указанных двух стратегий в одном центре. Успехи, достигнутые при попытках имитации активных центров при помощи небольших молекул, убеждают в целесообразности использования одной из указанных каталитических стратегий или их комбинации для ускорения реакции соединения нуклеотидов фосфодиэфирными связями при стемпинге апатитовой основы (разумеется, при условии термодинамической стабильности фосфодиэфирной связи в условиях опытов).

Для успешного осуществления реакции образования фосфодиэфирных связей при полимеризации нуклеотидов стемпингом апатитовой основы могут быть предприняты следующие шаги.

Приведение нуклеотидов в правильное взаимное расположение. Экспериментально установленный факт, что в момент, непосредственно предшествующий гидролизу РНК, биокатализаторы RNase A и *The hairpin ribozyme* раскручивают и распрямляют двухцепочечную молекулу полинуклеотида, что аналогичная раскрученная конфигурация двухцепочечного нуклеотида обнаруживается в полимеразах (Рис. 9-10), свидетельствует о целесообразности создания аналогичной взаимной ориентации соседних нуклеотидов при стемпинге. Последнее означает, что угол Р–О–Р образуемой фосфодиэфирной связи должен быть порядка 180° , а ось удлинения уотсон-криковской пары должна быть перпендикулярна направлению удлинения образуемой цепочки полинуклеотида. Целесообразность создания такой конфигурации нуклеотидов а процессах стемпинга следует также из данных о влиянии стэкинга на каталитический гидролиз олигомеров РНК, обсуждённых в разделе 9.2.1. Согласно этим данным, напомним, стэкинг, осуществляемый непосредственно следующими друг за другом азотистыми основаниями нуклеотидов одной цепи, препятствует протеканию реакции, в то время как стэкинг, осуществляемый при посредничестве интеркалирующего агента, как на Рис. 9-24, реакцию многократно ускоряет.

Учитывая взаимосвязь между геометрическими характеристиками, описывающими расположение нуклеотидов в строчке основы, см. Рис 4-2, вышеизложенное означает, что достижение переходного состояния и образование фосфодиэфирных связей будет затруднено при конфигурации строчки, показанной на верхнем изображении Рис 4-2. В то же время, конфигурация, показанная на нижнем изображении того же рисунка, когда строчка основы примерно перпендикулярна оси удлинения уотсон-криковской пары, а стэкинг-взаимодействие азотистых оснований опосредовано интеркалирующим агентом, в точности соответствует желаемой. Последнее означает, в частности, что расположение строчки на грани призмы $[11\bar{2}0]$ апатита, показанное на Рис 7-4, является менее подходящим для синтеза, нежели расположение строчки на той же грани, изображённое на Рис 7-3. Наиболее подходящим из обсуждённых в главе 7 следует признать строчку на грани $[10\bar{1}0]$, в которой центры тетраэдров имеют координаты

$$\left(x, y, n + \frac{1}{4}\right) \text{ и } \left(x + 2, y, n + \frac{1}{4}\right), \text{ где } n = 0, 1, 2, \dots$$

В такой строчке уотсон-криковские пары расположены перпендикулярно оси удлинения полимера (оси z кристалла), то есть конфигурация совпадает с конфигурацией, наиболее подходящей для синтеза.

Ещё один вывод, важный для приложений, вытекающий из вышеизложенного, состоит в целесообразности использования интеркалирующих агентов при стемпинге.

Создание конфигурации, имитирующей активный центр биметаллической гидролазы. Активные центры ферментов, в которых рассеаемый фосфат в момент катализа расположен между двумя атомами металла, обнаруживают сходство с конфигурацией атомов, возникающей на гранях апатитовых кристаллов, погружённых в раствор. Как отмечалось выше, межатомные расстояния Me–P Me–Me в центре близки к таковым в апатите, а координационные числа катионов в центре, существенно меньшие, нежели в апатите, могут возникнуть на поверхности кристалла вследствие незавершённости их координационной сферы. Тем самым, если катион Ca^{2+} апатита (не поддерживающий катализ) заместить, частично или полностью, одним из катионов, обнаруживаемых в активном центре (Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и Mn^{2+}), то конфигурация, воспроизводящая активный центр автоматически будет создана вокруг фосфатных групп нуклеотидов. (На целесообразность таких замещений уже указывалось выше, в главе 7. Перечисленные катионы имеют ионный радиус меньше чем у Ca^{2+} , поэтому введение их в состав апатита может понадобиться для соблюдения принципа геометрического соответствия, когда параметр c решётки оказывается равен длине фосфодиэфирной связи.) Помимо замещений в решётке апатита, используемого в качестве основы, возможна и другая схема катализа, когда в замещение вовлечены лишь катионы из гидратированного слоя апатита. Таким способом можно добиться более высокой концентрации катализатора в случае ограниченного вхождения соответствующего катиона в апатит (Zn^{2+}), или использовать в качестве катализатора такой катион, как Mg^{2+} , который не входит в существенных количествах в апатит, но при этом активно замещает Ca^{2+} в гидратированном слое.

По всей видимости, строение активных центров биметаллических гидролаз и других ферментов центров с двумя катионами металла в активном центре воспроизводит конфигурацию атомов, возникшую самопроизвольно на поверхности апатитовых кристаллов, используемых для стемпинга на ранних стадиях эволюции. Этим может быть объяснено сходство в строении активных центров ферментов, зачастую никак между собой не связанных филогенетически. Однако для осуществления каталитического соединения нуклеотидов фосфодиэфирными мостиками при стемпинге могут быть испробованы и катионы, не используемые в активных центрах ферментов, но обладающих более высокой каталитической активностью, такие, как Gd^{3+} , Ce^{4+} , Pr^{3+} , Eu^{3+} .

Помимо использования высокотоксичных катионов, остаётся ещё возможность использования имидазольного буфера для катализа, обнаруженная при исследовании возможности имитации RNase A. К такому же выводу приводят и результаты обсуждавшихся выше экспериментов с *abasic ribozymes*. Тот факт, что комбинирование имидазольного буфера с двухвалентными катионами ведёт к многократному усилению каталитической активности, говорит о возможности задействовать обе каталитические стратегии в экспериментах.

По всей видимости, перечисленных возможностей – расположение нуклеотидов в способствующей протеканию реакции взаимной ориентации, имитация активного центра в виде двух атомов металла и дальнейшее усиление каталитической активности посредством имидазольного буфера – будет достаточно для осуществления полимеризации нуклеотидов в экспериментах в условиях, когда фосфодиэфирная связь является термодинамически стабильной. Если же перечисленные стратегии не сработают, остаётся ещё возможность использования конъюгатов аминов и (или) имидазола с интеркалирующими агентами, обсуждавшаяся в разделе 9.2.1.

10. Условия стабилизации фосфодиэфирных связей.

Термодинамическая стабильность фосфодиэфирных мостиков, соединяющих рибозы в цепочке полинуклеотида, составляет одно из условий осуществимости абиогенной полимеризации нуклеотидов путём стемпинга. Мерой стабильности связи может служить величина свободной энергии Гиббса соответствующей реакции полимеризации,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \Delta U + P\Delta V - T\Delta S.$$

С формальной точки зрения, для стабилизации связи достаточно найти значения термодинамических параметров – температуры, рН, концентрации солей, гидростатического давления и осмотического давления, при которых выполнено условие $\Delta G < 0$. Однако на практике этого оказывается недостаточно. Возможность завершения реакции за приемлемое время экспериментов предполагает, что значение ΔG не должно быть слишком малым по абсолютной величине. Поэтому для нас важно не только найти условия, в которых величины ΔG для реакций переэтерификации (Рис 9-1а) и гидролиза (Рис 9-1б) фосфодиэфирной связи отрицательны, но и идентифицировать параметр (или параметры), варьируя который степень стабилизации фосфодиэфирной связи можно было бы изменять по своему усмотрению.

Задача отыскания условий стабилизации фосфодиэфирных связей трактуется по-разному, в зависимости от целей эксперимента. Если стемпинг осуществляется ради синтеза полинуклеотидов в прикладных целях, достаточно идентифицировать значения параметров равновесия, при которых эта связь обретает стабильность. Если же цель экспериментов в нахождении условий, в которых могла возникнуть жизнь, стабилизацию фосфодиэфирных связей необходимо осуществить, не нарушая других взаимодействий, принимающих участие в стемпинге – стэкинга и водородных связей в уотсон-криковских парах. Кроме того, образование интеркалятов может стать одним из условий успешного осуществления стемпинга (см главу 9). По этой причине в настоящей главе собраны сведения о термодинамике всех взаимодействий, вовлечённых в реакции, протекающие при стемпинге.

Необходимость рассмотрения большого массива термодинамических сведений и их сравнительного анализа может оказаться утомительной для читателя, чьи профессиональные интересы не связаны непосредственно с термодинамикой полинуклеотидов. Однако, при всей громоздкости настоящей главы, основной её сюжет прост. Интрига, напомним, состоит в отыскании параметра, варьируя который можно добиться существенной стабилизации фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах, т.е. выполнения условия $\Delta G < 0$. Анализ данных об энергетике взаимодействий в полинуклеотидах при условиях, близких к физиологическим, выполненный в разделе 10.1, показывает, что фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах термодинамически стабильны по отношению к переэтерификации, а ΔG реакции гидролиза этих связей очень близка к нулю. Ввиду близости к нулю величины ΔG , возникает предположение, что выполнения условия $\Delta G < 0$ можно будет добиться, варьируя физико-химические параметры равновесия. Данные, обсуждаемые в разделах 10.2 – 10.4 показывают, что вариации температуры, состава и рН раствора не приводят к значительной стабилизации фосфодиэфирных связей. В частности, вопреки ожиданиям, нет признаков того, что стабилизации фосфодиэфирных связей по отношению к гидролизу можно было бы добиться, снижая активность воды в системе. Последнее обстоятельство, несколько парадоксальное, указывает на стабилизирующее воздействие воды на полинуклеотиды, что согласуется с результатами структурных исследований, свидетельствующих о структурообразующей роли молекул воды, сосредоточенных в малой бороздке двойной спирали (раздел 10.4.1). В этой связи интересно отметить, что согласно имеющимся волюметрическим и спектроскопическим данным, для связанных с полинуклеотидами молекул воды характерны необычно низкие значения удельного объёма. Если такие

молекулы воды, с малым удельным объёмом, составляют отличительную особенность полинуклеотидов, но не мономеров, тогда полинуклеотиды (согласно принципу Ле Шателье) должны быть термодинамически стабильны при высоком гидростатическом давлении. Данные о влиянии давления на активность рибозимов не оставляют сомнения в том, что это действительно так. Рассечение фосфодиэфирной связи в полинуклеотидах посредством переэтерификации и гидролиза сопровождается значительным увеличением объёма (раздел 10.5.5.3). Оценки соответствующих объёмных эффектов в соединении с экспериментальными данными об устойчивости ДНК и РНК при высоких давлениях (по крайней мере до 14 kbar, вероятно и выше, раздел 10.5.5.1) приводят к выводу, что при достаточно высоком давлении стабилизация фосфодиэфирных связей будет значительным. Синтез полинуклеотидов стемпингом в этих условиях, вероятно, будет возможен даже без использования катализаторов. В дополнение к этой, основной, сюжетной линии, в главе показано также, что при высоких концентрациях некоторых электролитов повышение давления не приводит к дестабилизации уотсон-криковских пар, стэкинга и, в целом, не препятствует образованию интеркалятов. Этим и определяется область условий, в которых полинуклеотиды могли возникнуть в природе спонтанно, без участия рибозимов и ферментов. Ещё один вывод, важный в практическом отношении, состоит в том, что фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах, адсорбированных основой, стабильнее аналогичных связей в свободных молекулах на величину т.н. «энтропийного штрафа» (заключительная часть раздела 10.1.2).

10.1. Термодинамика и энергетика связей в полинуклеотидах.

Полинуклеиновые кислоты – это многоуровневые объекты сложной природы. На раннем этапе их исследования, в середине 1950-х, сформировалось представление о возможности разделить взаимодействия, удерживающие атомы полинуклеотидов вместе, на сильные и слабые. Ковалентные связи в цепочках, в том числе фосфодиэфирные связи, считались сильными. В качестве слабых упоминались водородные связи в уотсон-криковских парах, стэкинг и электростатические взаимодействия между соседними основаниями в цепочке, а также т.н. гидрофобные взаимодействия. По мере накопления и осмысления экспериментальных данных выяснилось, что вклад «слабых» взаимодействий превосходит вклад фосфодиэфирных связей в энергетике ДНК и РНК. Одновременно, по мере конкретизации и детализации представлений о взаимодействии РНК и ДНК с водой, вышел из употребления и термин «гидрофобные взаимодействия», хотя он по сей день используется в учебной литературе.

10.1.1. Энергетика водородных связей и стэкинга.

Водородные связи в уотсон-криковских парах и стэкинг обеспечивают удержание двух комплементарных цепочек полинуклеотидов в виде двойной спирали. При достаточно высокой температуре двойная спираль расплетается с образованием двух одноцепочечных молекул. Процесс этот, по-русски называемый *денатурацией* ДНК или РНК, напоминает фазовый переход первого рода, протекающий в узком диапазоне температуры. В силу этого имеет смысл говорить о температуре процесса, обозначаемой символом T_m . В англоязычной литературе денатурацию двухцепочечных РНК или ДНК (а также и химер состоящих из одной цепочки ДНК и одной РНК) именуют *плавлением* (*melting*), самим названием подчёркивая, что превращение протекает в узком диапазоне температуры.

Величины энтальпии денатурации двухцепочечных полинуклеотидов, ΔH_m , могут служить оценкой совместного вклада стэкинга и водородных связей в энергетике молекулы. Имеется два типа оценок энтальпии денатурации: оценки, основанные на моделировании экспериментальных замеров T_m , и прямые замеры ΔH_m методами калориметрии.

Данные о зависимости T_m от состава и особенностей структуры полинуклеотида, ионной силы раствора, длины олигомера, давления и других характеристик имеет большое прикладное значение. Для практических приложений эти данные обычно интерполируются с применением термодинамического моделирования, и получаемые модели могут служить источником сведений об энергетике взаимодействий. Термодинамические характеристики, полученные моделированием T_m , отличаются высокой степенью детальности. Имеются, например, термодинамические модели РНК, учитывающие особенности всех структурных элементов, включая шпилечные структуры, выступы и т.д., [583]. Построены термодинамические модели денатурации не только для олигомеров ДНК, но и для олигомеров ДНК с т.н. висячими концами (*dangling ends*), [584]. Однако оценки термодинамических величин, получаемые обычно с использованием уравнения ван't Гоффа, зависят (и существенно) от постулируемого механизма превращения. Проявлением этой неопределённости, видимо, служит тот факт, что полученные оценки энтальпии превращения обнаруживают систематические отличия, смотря по тому, фиксировалась ли величина T_m по изменениям в ИК- или в УФ-спектрах. Современные калориметрические оценки энтальпии денатурации ДНК и РНК несомненно более надёжны. Однако более высокая разрешающая способность метода оценок, основанных на моделировании T_m , позволила выявить важную особенность взаимодействия азотистых оснований нуклеотидов – кооперативность. Замерами T_m для небольших олигомеров ДНК показано, что энергетический «пай», вносимый нуклеотидом, зависит от того, какие нуклеотиды расположены справа и слева, так что нуклеотиды в цепочке, отстоящие на четыре единицы, всё еще «чувствуют» присутствие друг друга.

Значения ΔH_m реакций денатурации ДНК и РНК, определённые методами калориметрии, варьируют от 6 до 12 kcal/mol (в пересчёте на уотсон-криковскую пару). На более раннем этапе исследований вариации ΔH_m связывали с изменениями нуклеотидного состава и их последовательности, а также ионной силы раствора. Однако в начале 2000-х авторами [585,586] была продемонстрирована ошибочность подобных представлений.

Авторы [585,586] обратили внимание, что изменения структурных особенностей нуклеиновых кислот и состава раствора сопровождаются значительным изменением температуры денатурации (T_m): от 35° до 110° С. Тем самым значения ΔH_m определяются при разной температуре, и непосредственное их сравнение неправомерно. В принципе, величины энтальпии превращения, определённые при разной температуре, имеет смысл сравнивать, только если сравниваемые вещества имеют одну и ту же величину теплоёмкости C_p . Однако, авторы цитируемых работ продемонстрировали с помощью высокоточного дифференциального сканирующего калориметра, что величина C_p всегда возрастает при денатурации, в среднем на $\Delta C_p = 46.4 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$. В результате энтальпия ΔH_m оказывается зависимой от температуры, при которой производится измерение, т.е. от температуры превращения T_m . Значения ΔH_m , измеренные предшествующими авторами для различных образцов ДНК, РНК и двухцепочечных химер, состоящих из ДНК и РНК, как оказалось, действительно располагаются вблизи прямой линии в координатах $\Delta H_m - T_m$, Рис.10-1 и при этом угол наклона прямой, 47cal/K, практически совпал с усреднённым измеренным значением $\Delta C_p = 46.4 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$.

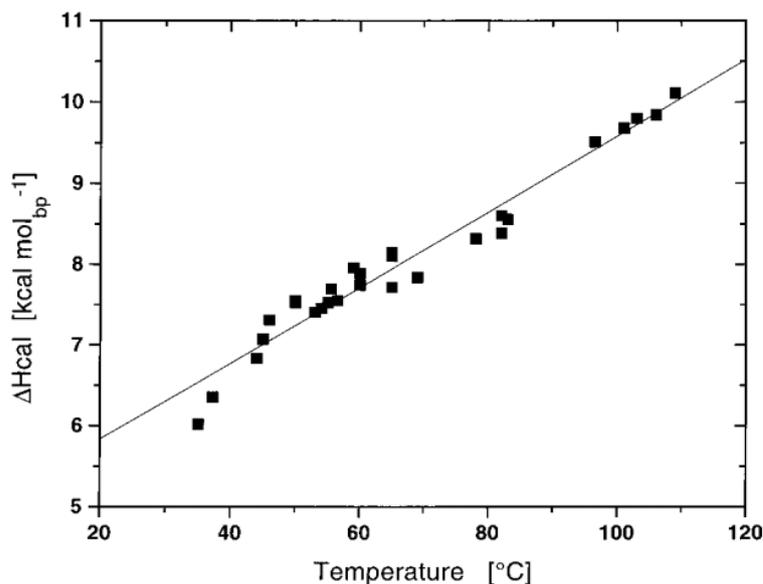


FIG. 2. Comparison of the published calorimetric enthalpy values for all RNA/RNA, RNA/DNA, and DNA/DNA polynucleotide duplexes plotted against their melting temperatures. The experimental data in Fig. 2 (■) are taken from the extensive collection of polynucleotide thermodynamic data compiled by Klump (3, 9). The solid line corresponds to the best fit straight line to these values. This line has a slope, $\Delta H/T_m (= \Delta C_p)$, equal to $47 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot (\text{mol of base pair})^{-1}$.

Рис 10-1. Зависимость энтальпии денатурации двухцепочечных полинуклеотидов (ΔH_m) от температуры денатурации (T_m). Угол наклона прямой, 47 cal/K , практически совпадает с усредненным приращением теплоёмкости $\Delta C_p = 46.4 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$. Из работы [585].

Для сравнения значений ΔH_m , полученных для полинуклеотидов различающихся по составу, авторы [585] экстраполировали их к одной температуре, 25°C , используя усреднённое значение приращения теплоёмкости ΔC_p . После экстраполяции все значения ΔH_m оказались очень близкими, в диапазоне от 6.06 до 7.48 kcal/mol . Тем самым вариации измеряемых значений ΔH_m , повторюсь, от 6 до 12 kcal/mol , увязываемые более ранними авторами с особенностями структуры полинуклеотидов и состава раствора, на самом деле отражают вариации температуры T_m .

Низкая чувствительность энтальпии денатурации ΔH_m к структурным особенностям полинуклеотидов наряду с высокой вариативностью T_m (от 35 до 110°C) предполагает, что энтропия денатурации должна быть параметром, высокочувствительным как к структурным особенностям полимера, так и к составу раствора. Подобные изменения действительно обнаружены, [586], однако вопрос этот изучен недостаточно.

Выше уже было упомянуто, что энергия денатурации полинуклеотидов складывается главным образом из энергий стэкинга и водородных связей в уотсон-криковских парах. Вопрос о соотношении этих двух вкладов в величину ΔH_m обсуждается не один десяток лет. В конце 1980-х – начале 1990-х считалось, что на долю водородных связей приходится $3\text{-}4 \text{ kcal/mol}$ (в пересчёте на пару оснований), а остальное следует отнести на счёт стэкинга и других, не идентифицированных взаимодействий, [587]. Более точные оценки имеются для конкретных полимеров. Например, в гл. 13 недавно опубликованной монографии [588] вклад водородных связей в ΔH_m для $(A \cdot U)_n$ оценивается в 38 kJ/mol при 60°C . Указывается также, что для пары $G \cdot C$ вклад водородных связей должен быть несколько большим.

Оценка энергии стэкинга, не содержащая вклада от водородных связей, может быть получена из данных по калориметрии интеркалирования. При реакции интеркалирования плоская молекула, обычно содержащая несколько ароматических колец, помещается между двух соседних пар нуклеотидов двойной спирали ДНК или РНК без разрыва

ковалентных связей, как на Рис. 9-24. При интеркалировании происходит частичное раскручивание и удлинение ДНК в непосредственной окрестности внедрившейся молекулы, при этом расстояния между фосфатными группами не увеличиваются, [461, 465]. Энергия стэкинга является главной движущей силой при образовании интеркалята, однако калориметрические характеристики соответствующей реакции, подобно энергии денатурации, опять-таки представляют собой суммы двух вкладов – в этот раз стэкинга и энергии деформации углов связей, возникающей за счёт локального раскручивания ДНК.

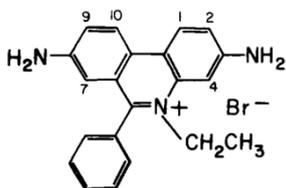


Рис 10-2. Структурная формула бромида этидия.

Наиболее детально изучены реакции интеркалирования ДНК, хотя многие интеркалирующие агенты, такие как этидиум, Рис. 10-2, встраиваются и в двухцепочечные спиральные участки молекул РНК, [589,590]. С точки зрения возможностей использования интеркалятов при абиогенном синтезе полинуклеотидов, наибольший интерес представляет бромид этидия. Этот агент связывается с ДНК активнее прочих, локально раскручивает ДНК на максимальный угол (26° на каждую позицию интеркалирования, [461]) и, что особенно важно, не обнаруживает селективности, [591]. В недавнем калориметрическом исследовании [592] получены следующие значения энергетических параметров реакции интеркалирования ДНК вилочковой железы телёнка бромидом этидия (при 298К): $\Delta H -9.32 \pm 0.60$ kcal/mol, $T\Delta S -2.20$ kcal/mol, $\Delta G -7.12$ kcal/mol. Тем самым, энтальпия интеркалирования на 2-3 kcal/mol превосходит энтальпию денатурации.

10.1.2. Энергетика фосфодиэфирных связей.

Реакция образования полинуклеотидов из нуклеозидмонофосфатов может быть осуществлена тремя разными способами: в качестве исходных можно использовать нуклеозид-3'-фосфаты, нуклеозид-5'-фосфаты и нуклеозид-3'5'-циклофосфаты (а также их смеси). В первых двух случаях реакция сопровождается образованием фосфодиэфирной связи (реакция, обратная гидролизу фосфодиэфирной связи). В третьем случае имеет место переэтерификация, т.е. не образование, а перенос фосфодиэфирной связи. Примеры двух из этих типов реакций – с участием 3'-фосфатов и циклофосфатов – обсуждались выше, в главе 9, при обсуждении каталитических механизмов образования фосфодиэфирной связи в природе. Примеры осуществления реакций третьего типа в природе – образование нуклеозид-5'-фосфатов при гидролизе фосфодиэфирной связи или поликонденсация нуклеозид-5'-фосфатов – мне неизвестны. Тем не менее, последняя группа реакций наиболее детально изучена с энергетической точки зрения, вероятно потому, что в природе полинуклеотиды образуются из нуклеозид-5'-дифосфатов и нуклеозид-5'-трифосфатов.

Вопросы энергетики фосфодиэфирных связей овеяны легендами, восходящими к тем временам, когда технических возможностей калориметрической оценки энтальпии и свободной энергии соответствующих реакций не существовало. Ныне они изучены более или менее детально (хотя объём данных по термодинамике реакций с участием нуклеотидов и сейчас на порядки уступает объёму данных по их кинетике и катализу). Однако устоявшиеся представления, сложившиеся несколько десятилетий назад, всё ещё имеют широкое распространение. Одно из таких мнений, упоминавшееся ранее, состоит в отнесении фосфодиэфирных связей к «сильным» взаимодействиям, а водородных связей и стэкинга – к «слабым». Утверждается, что разрыв или создание фосфодиэфирных связей

сопровождается выделением или затратами значительных количеств энергии, многократно превосходящих энергию, необходимую для разрыва водородных связей или стэкинга. Кроме того, распространено мнение о термодинамической неустойчивости фосфодиэфирной связи по отношению к гидролизу, вследствие которой сочленение нуклеотидов фосфодиэфирными связями при сборке ДНК и РНК требует значительных затрат энергии. В то же время реакцию переэтерификации считают «энергетически нейтральной», полагая, что перенос фосфодиэфирной связи требует значительно меньших затрат энергии, нежели образование этой связи *de novo*.

Представления о фосфодиэфирных связях как о «сильных» но в термодинамическом отношении глубоко нестабильных не лишены правдоподобия. В самом деле, для сборки ДНК и РНК из нуклеотидов, катализируемой полимеразми или аденилаткиназами, в природе используются, соответственно, NTP и NDP (нуклеозидтрифосфаты и нуклеозиддифосфаты). Создаётся впечатление, что процессы эти осуществляются за счёт энергии, выделяемой при гидролизе полифосфатной связи. В случае полимераз, например, источником энергии служит энтальпия гидролиза нуклеозидтрифосфатов (NTP) в реакции



(символом PPi обозначен пирофосфат). В то же время, иллюстрацией «энергетически нейтрального» статуса реакций переэтерификации мог бы служить тот факт, что эта реакция осуществляется, как правило обратимо, разнообразными ферментами и рибозимами без использования каких-либо внешних источников энергии (см. главу 9). При всём правдоподобии, взгляды эти, как оказалось, имеют мало общего с реальностью.

К середине 1970-х были экспериментально определены константы равновесия K для многих фундаментальных реакций с участием полинуклеотидов. Для достижения равновесия в экспериментах по их определению используются природные ферменты. Значения K были определены для таких реакций, как синтез одноцепочечной РНК из рибонуклеотиддифосфатов (катализируемый ферментом полинуклеотидфосфорилазой), синтез одноцепочечной ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (в присутствии фермента терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы), гидролитическое расщепление одноцепочечных полинуклеотидов ферментом эндонуклеазой, репликация ДНК с использованием дезоксирибонуклеотидов, гидролитическое расщепление двухцепочечной ДНК, реакция починки двухцепочечной ДНК надрезанной с одной стороны с использованием АТФ или НАД⁺ (в присутствии фермента лигазы), а также ряда других.

Из величины K , как хорошо известно, можно вычислить изменение свободной энергии (Гиббса) в ходе реакции,

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K.$$

В работе [593], на основании констант перечисленных выше реакций (по состоянию на 1975 г.) было показано, что энергия образования/гидролиза фосфодиэфирной связи мала, соизмерима с энергией стэкинга, что энтропия (а не энтальпия) является движущей силой процессов синтеза полинуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов и нуклеозиддифосфатов. Выводы эти, как ни странно, не изменили взглядов большинства биохимиков на энергетику полинуклеотидов.

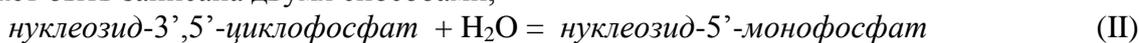
Справедливости ради следует отметить, что оценки ΔG , определяемые из величины K , не являются модельно независимыми. Участие полинуклеотидов в реакциях предполагает использование термодинамических моделей полиэлектролитов, теория которых была и остаётся недостаточно разработанной. Поэтому обоснованность полученных оценок ΔG действительно вызывает вопросы. Кроме того, исследуемые реакции проводятся в различных условиях, поскольку используемые в них ферменты, каждый, имеет свой оптимальный диапазон рН, ионной силы, концентрации Mg^{2+} и т.д. Для сравнения полученных значений ΔG их пересчитывают к неким стандартным условиям. Например, свободная энергия реакции гидролиза АТФ с образованием АМФ и PPi, как в реакции (I),

изменяется от -10.9 kcal/mol до -11.6 kcal/mol при увеличении концентрации Mg^{2+} от 1 до 10 мМ, [594]. Уравнения пересчёта термодинамических величин для большого количества реакций с участием нуклеотидов были выведены в работах [595,596]. Эти уравнения, опубликованные в 1969 г., используемые и поныне, получены в приближении теории бесконечно разбавленных электролитов (методов расчёта активностей в концентрированных растворах электролитов тогда не существовало). Как отмечают сами авторы, им часто приходилось использовать данные, полученные в достаточно концентрированных растворах, и это тоже могло привести к возникновению систематических погрешностей.

Тем не менее, при всех недостатках используемых моделей, они не могут радикально повлиять на полученные оценки термодинамических параметров. Ошибки, протекающие от несовершенства термодинамических моделей, как правило, лежат в пределах $\pm 1-2$ kcal/mol. В настоящее время для ряда реакций с участием нуклеотидов и полинуклеотидов имеются достоверные калориметрические данные. Оценки ΔG , полученные из констант равновесия согласуются (в пределах ± 2 kcal/mol) с калориметрическими.

Ниже приведены калориметрические данные о реакциях с участием нуклеотидов, протекающих с образованием или разрывом фосфодиэфирной связи. Оценки ΔG , полученные из констант равновесия, приводятся лишь в случае отсутствия надёжных калориметрических данных.

Гидролиз нуклеозидциклофосфатов. Реакцию гидролиза нуклеозид-3',5'-циклофосфата может быть записана двумя способами,



или



смотря по тому, какая связь – 3' или 5' – подвергается разрыву. На Рис. 10-3 показана схема реакции (II). Эта реакция изучена тщательнее реакции (III).

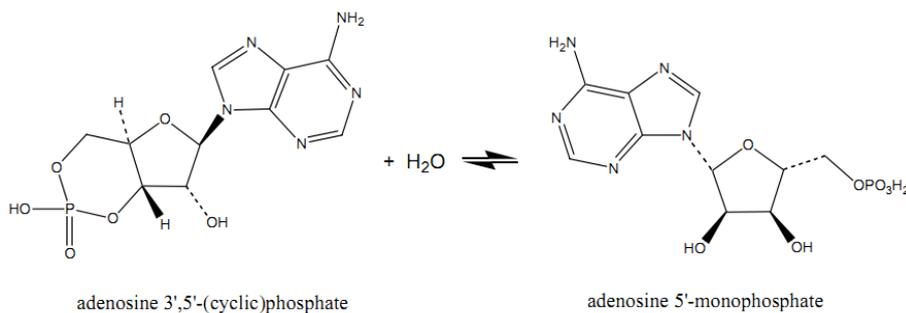


Рис 10-3. Структурные формулы молекул, участвующих в реакции (II).

Энтальпии гидролиза пяти нуклеозид-3',5'-циклофосфатов, а также четырех нуклеозид-2',3'-циклофосфатов были измерены в работе [597], опубликованной в 1971 г. Условия экспериментов, в том числе ферменты, использованные в качестве катализаторов, приведены в Таблице 10-1. Результаты замеров показаны в Таблице 10-2. Помимо энтальпии гидролиза авторы также определили количество высвобождаемых протонов.

Таблица 10-1. Условия калориметрических экспериментов по определению энтальпии гидролиза циклических нуклеотидов, выполненных в работе [597].

Experimental conditions for calorimetric experiments^a

Cyclic nucleotide	pH	Buffer system	Enzyme
Cyclic 3',5'-IMP Cyclic 3',5'-dAMP	7.3	Potassium phosphate, 36 mM; imidazole, 1 mM; MgCl ₂ , 1 mM	Bovine heart phosphodiesterase ^b
Cyclic 3',5'-UMP	7.3	Potassium phosphate, 36 mM; imidazole, 1 mM; MgCl ₂ , 1 mM	Canine heart phosphodiesterase ^c
Cyclic 2',3'-AMP Cyclic 2',3'-GMP	6.5	Potassium phosphate, 36 mM; or Tris-HCl, 0.20 M	Ribonuclease T ₂ ^d
Cyclic 2',3'-CMP Cyclic 2',3'-UMP	7.3	Potassium phosphate, 36 mM	Ribonuclease A ^e

^a All at 25°.

^b Prepared according to the method of Butcher and Sutherland (7), with minor modifications.

^c Prepared according to the method of Nair (8).

^d From Calbiochem (prepared by Sankyo Chemical Company, Tokyo, Japan).

^e From Worthington.

Таблица 10-2. Энтальпии гидролиза пяти нуклеозид-3',5'-циклофосфатов и четырёх нуклеозид-2',3'-циклофосфатов по данным работы [597].

Results of calorimetric experiments

Cyclic nucleotide	Protons liberated	ΔH^a	Average ΔH^a
		<i>kcal mole⁻¹</i>	<i>kcal mole⁻¹</i>
Cyclic 3',5'-AMP ^b	0.86	-14.0	-14.1
		-14.6	
		-13.9	
		-13.9	
Cyclic 3',5'-GMP ^b	0.80	-10.5	-10.5
		-10.5	
		-10.4	
Cyclic 3',5'-IMP	1.0	-13.5	-13.4
		-13.5	
		-13.2	
Cyclic 3',5'-dAMP	1.0	-12.6	-13.0
		-13.1	
		-13.4	
Cyclic 3',5'-UMP	1.0	-12.3	-12.0
		-11.8	
		-12.0	
Cyclic 2',3'-AMP	0.86	-9.8	-9.4
		-9.1	
		-9.4	
Cyclic 2',3'-GMP	0.60	-9.9	-9.5
		-9.2	
		-9.5	
Cyclic 2',3'-CMP	0.88	-8.2	-8.1
		-7.9	
		-8.0	
Cyclic 2',3'-UMP	0.68	-8.0	-7.8
		-7.5	

^a Corrected for heat of protonation of buffer and, in the case of flow calorimetry, for viscous heating effects.

Имеются более точные и более современные замеры энтальпии гидролиза циклофосфата аденозина, см. например работу [598] и содержащиеся в ней ссылки. Однако для нас важнее возможность сопоставления данных для большого количества нуклеотидов, полученных в сходных условиях, и более поздние публикации такой возможности не дают. Как можно видеть в Таблице 10-2, все исследованные 3',5'-циклофосфаты имеют высокие значения энтальпии гидролиза: от -14.1 kcal/mol для циклофосфата аденозина до -10.5 kcal/mol для циклофосфата гуанозина. Сравнение с

данными для 3',5'- и 2',3'-циклофосфатов аденозина, имеющихся в поле поздних публикациях [598,599], приводит к выводу, что энтальпийные эффекты, измеренные в [597], вероятно, завышены на 1.5-2 kcal/mol (по абсолютной величине). Тем не менее, ясно, что энтальпия гидролиза циклофосфатов имеет высокие значения. Тепловая энергия, выделяемая при гидролизе аденозин-3',5'-циклофосфата, выше, чем, например, при гидролизе АТФ (свободная энергия гидролиза АТФ составляет -11 kcal/mol).

В работе [597] определены лишь энтальпии разрыва фосфодиэфирной связи в позиции 3'. Для нас важно выяснить, будет ли разрыв фосфодиэфирной связи в положении 5' сопровождаться выделением такого же количества энергии. К счастью последний вопрос был разъяснён авторами [599] на примере аденозин-3',5'- циклофосфата. В качестве катализатора эти авторы использовали фермент фосфогидролазу из *Enterobacter aerogenes*, катализирующий разрыв фосфодиэфирной связи в позициях 3' и 5', в разных пропорциях. Согласно их замерам, энтальпия гидролиза (25° C) циклического АМР в положении 3' с образованием 5'-АМР, как в реакции (II), составляет 12.09 kcal/mol, а энтальпия гидролиза в положении 5' с образованием 3'-АМР, реакция (III), равна 11.49 kcal/mol. Тем самым, с практической точки зрения, нуклеозид-5'-монофосфаты термодинамически эквивалентны нуклеозид-3'-монофосфатам. Это означает, что обсуждаемые ниже оценки энергии фосфодиэфирной связи, измеренные относительно нуклеозид-5'-монофосфатов, могут быть перенесены на нуклеозид-3'-монофосфаты, представляющие бóльший интерес как исходные вещества для синтеза полинуклеотидов.

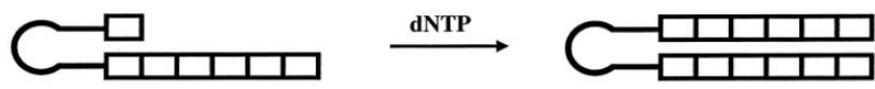
Забегая вперёд, отметим, что энтальпия гидролиза фосфодиэфирной связи в циклических нуклеозидмонофосфатах значительно превосходит энтальпию гидролиза той же связи в полинуклеотидах. Причины этого явления пока не ясны. В органической химии известно явление *ring strain*, заключающееся в том, что пятичленные циклы часто оказываются менее стабильными, чем аналогичные шестичленные циклы или ациклические аналоги. Признаки *ring strain* действительно обнаружены в некоторых органических фосфатах (диэтилфосфат, триметиленфосфат, тетраметиленфосфат и др., [599-602]), однако соответствующий избыток энтальпии для них не имеет такой амплитуды. Более того, из данных в Таблице 10-2 можно видеть, что энтальпия гидролиза нуклеозид-2',3'- циклофосфатов в среднем на 2-3 cal/mol ниже, чем у соответствующих 3',5'- циклофосфатов. Аналогичная закономерность показана в [599] на примере циклофосфатов аденозина. Однако в 2',3'- циклофосфатах фосфодиэфирные связи составляют сегменты пятичлѐнных колец, а у 3',5'- циклофосфатов – шестичлѐнных. Если бы высокие значения энтальпии гидролиза нуклеозидциклофосфатов были результатом *ring strain*, то у 2',3'- циклофосфатов энтальпия была бы выше. В действительности всё обстоит в точности наоборот. Тем самым, аномальные значения энтальпии гидролиза циклических нуклеозидфосфатов не связана с *ring strain*. Возможно, это проявление особенностей сольватации молекул нуклеотидов, [602].

Данные для фосфодиэфирной связи в одноцепочечных полинуклеотидах. В упоминавшейся выше работе [593] из данных о константах равновесия реакций с участием олигомеров ДНК и РНК получена оценка величины свободной энергии гидролиза фосфодиэфирной связи $\Delta G \approx -1$ kcal/mol. Авторы не проводят различий между рибонуклеотидами и дезоксирибонуклеотидами. Формально говоря, отрицательная величина свободной энергии говорит о термодинамической стабильности фосфодиэфирной связи, но точность использованных методов расчёта заведомо ниже ± 1 kcal/mol.

Данные для фосфодиэфирной связи в двухцепочечных полинуклеотидах. Имеется две работы, посвященные непосредственному калориметрическому исследованию процесса сборки ДНК из НТР, осуществляемому полимеразми. В первом из них – работе [603] – измерены тепловые эффекты инкорпорирования нуклеотида в двухцепочечную ДНК.

Таблица 10-3. Олигомеры со структурой шпильки и «висячим» концом длиной до пяти нуклеотидов, использованные в качестве праймера и матрицы при синтезе ДНК в работе [603].

Table 1. Self-priming template hairpin sequences and their designations



Deoxyoligonucleotide sequence	Template sequence	Hairpin designation
<u>AGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	1A	G-CH(A) _n series
<u>AAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	2A	G-CH1A
<u>AAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	3A	G-CH2A
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	4A	G-CH3A
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	5A	G-CH4A
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	5A	G-CH5A
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCT</u>	4A	G-CH(A-T) _n series
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTT</u>	3A	G-CH5A-1T
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTT</u>	2A	G-CH5A-2T
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	1A	G-CH5A-3T
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	1A	G-CH5A-4T
<u>AAAAATCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGA</u>	5A	T-AH
<u>AAAAATCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGA</u>	5A	T-AH5A
<u>TTTTTGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	5T	G-CH(T) _{1,5}
<u>TGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGC</u>	1T	G-CH5T
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCdT</u>	NE	G-CH1T
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	NE	Terminated
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	NE	G-CH5A-dT
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	NE	Fully extended
<u>AAAAAGCTACTTTCCTTTTGGAAAGTAGCTTTT</u>	NE	G-CH5A-5T

Авторы [603] использовали модифицированную ДНК-полимеразу из *Escherichia coli* для синтеза ДНК. В норме эта полимераза обладает также активностью 3'-5' экзонуклеазы, используемой для выбраковки ошибочно инкорпорированных нуклеотидов, нарушающих принцип комплементарности. Используемый авторами фермент обладал только активностью полимеразы; активность 3'-5' экзонуклеазы в нем была подавлена искусственными мутациями. В качестве субстрата использовались олигомеры ДНК со структурой шпильки, снабжённые «висячим» концом длиной до пяти нуклеотидов, служившие одновременно и праймером, и матрицей. Схема и нуклеотидный состав использованных шпилечных олигомеров показаны в Таблице 10-3.

Используя высокоточный калориметр, авторы [603] измерили количества теплоты, выделяемые при заполнении «висячего» конца нуклеотидами dA или dT, в соответствии с принципом комплементарности. Измеренные тепловые эффекты, оказавшиеся экзотермическими, варьировали от -9.8 до -16.0 cal/mol (в пересчёте на пару нуклеотидов). Тепловые эффекты менялись в зависимости от того, какой нуклеотид инкорпорировался, какой нуклеотид предшествовал инкорпорированному в последовательности, и как далеко инкорпорированный нуклеотид располагался от конца шпильки. Величины тепловых эффектов, как оказалось, коррелируют с энтальпиями ренатурации ДНК для соответствующих последовательностей нуклеотидов (ренатурацией ДНК называют процесс, противоположный денатурации, т.е. воссоединение двух комплементарных цепочек в одну спиральную молекулу).

Энтальпия процесса матричного синтеза ДНК, осуществляемого ДНК-полимеразой, складывается из энтальпии образования фосфодиэфирной связи и энтальпии ренатурации двух комплементарных цепочек ДНК. Единственный вывод об энергетике фосфодиэфирной связи в ДНК, который можно сделать на основании данных работы [603], состоит в том, что энтальпия образования фосфодиэфирной связи мала по сравнению с энтальпией ренатурации. Вклад фосфодиэфирной связи неразличим на фоне многократно её превосходящей энергии ренатурации. По этой причине энтальпийные эффекты инкорпорирования нуклеотидов в двухцепочечный участок исследуемых шпилечных олигомеров оказались близки к энергиям ренатурации для соответствующих пар нуклеотидов (определённым из величины T_m , см выше).

Задача выделения сигнала от фосфодиэфирной связи на фоне многократно его превосходящего сигнала от ренатурации была успешно решена авторами недавно

опубликованной работы [604], соединившими высокую чувствительность используемого ими калориметра с оригинальностью схемы калориметрического эксперимента. Авторы [604] исследовали методом калориметрического титрования термодинамику последовательных стадий процесса обратной транскрипции (то есть синтеза ДНК по РНК-матрице), осуществляемого обратной транскриптазой вируса HIV типа I (reverse transcriptase, RT). Измерив тепловые эффекты реакций в достаточно широком диапазоне температуры, авторы смогли рассчитать не только энтальпийные, но и энтропийные эффекты. Оригинальность работы в том, что в ней исследована энергетика присоединения как дезоксирибонуклеотидов, так и дидезоксирибонуклеотидов к двухцепочечной ДНК. Именно это позволило определить вклад фосфодиэфирной связи в энергетику ДНК на фоне превосходящей её на порядок энергии ренатурации.

Дидезоксирибонуклеотид – это полученный искусственным образом нуклеотид, лишённый 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахарного кольца (Рис. 10-4, А). У дезоксирибонуклеотида, входящего в норму в состав ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа (Рис. 10-4, Б). Удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной группе последнего нуклеотида растущей цепи. И если таким очередным присоединённым звеном является дидезоксирибонуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь.

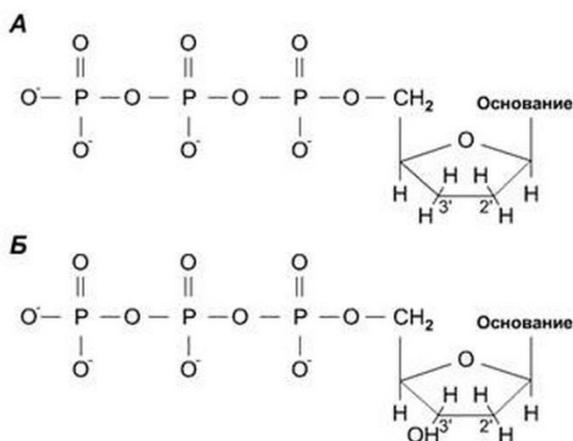


Рис 10-4. Отличие дидезоксирибонуклеотида от дезоксирибонуклеотида. А – дидезоксирибонуклеотид: отсутствуют 2'- и 3'-гидроксильные группы в дезоксирибозном кольце; Б – дезоксирибонуклеотид: отсутствует только 2'-гидроксильная группа.

Для полимеризации ДНК, как известно, помимо полимеразы и нуклеозидтрифосфатов нужны также праймер и матрица. Авторы [605] использовали небольшие олигомеры ДНК с «висячим» концом, Рис. 10-5, одновременно служившие праймером и матрицей.

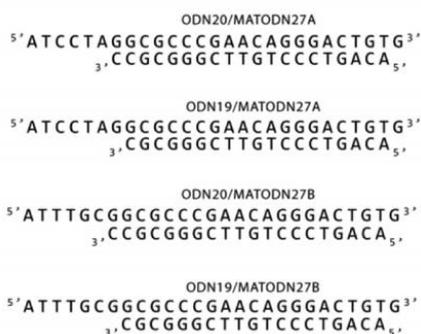
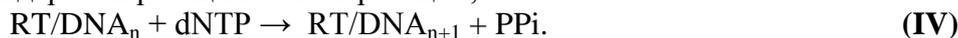


Рис 10-5. Отрезки двухцепочечной ДНК с «висячим» концом, использованные авторами [605] в качестве праймера и матрицы.

Свои опыты авторы [605] осуществляли в пять стадий, показанных на Рис 10-6. Процесс полимеризации начинался с образования комплекса, состоящего из RT и праймера-матрицы, обозначаемого как RT/DNA, (1). Затем авторы последовательно

присоединяли к праймеру по одному нуклеотиду. На стадиях (2) и (3) они добавляли раствор нуклеозидтрифосфата (dNTP) к комплексу RT/DNA, тем самым осуществляя один шаг стандартной реакции полимеризации,



На стадии (4) dNTP был заменён на дидезоксинуклеозидтрифосфат (ddNTP). Наконец, на стадии (5) к праймеру-матрице снова добавлялось контролируемое количество dNTP.

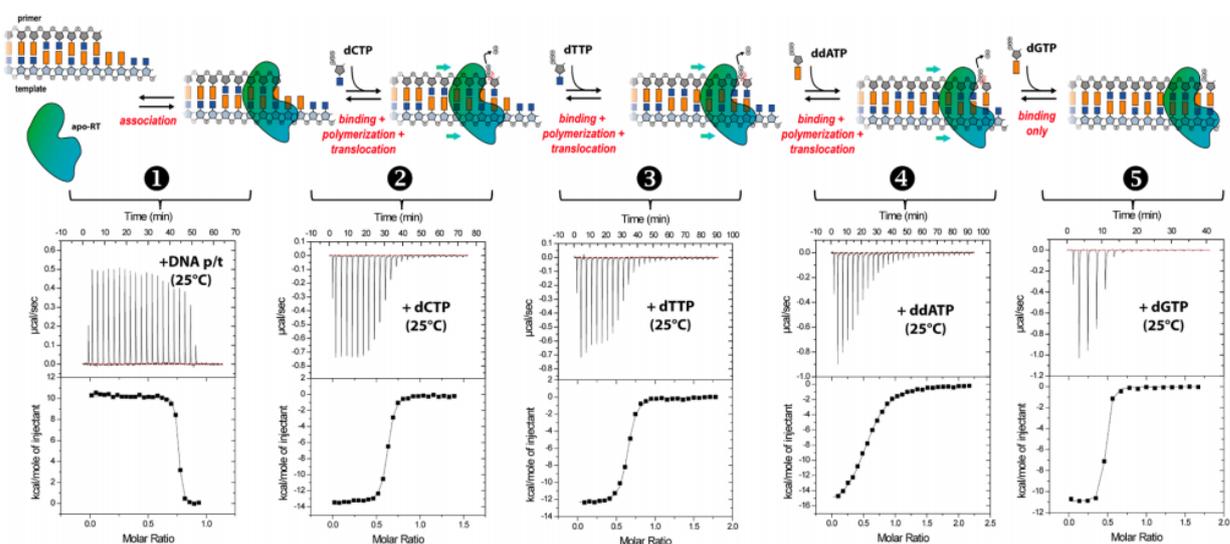


Figure 2. Example of incremental-ITC experiment. Five successive experiments were performed at 25 °C on the same sample: addition of (1) DNA primer-template ODN19/MATODN27B (560 μM) into RT (60 μM in the ITC cell), followed by sequential injection of the incoming nucleotides (2) dCTP, (3) dTTP, (4) ddATP, and (5) dGTP (900 μM).

Рис 10-6. Последовательные стадии процесса полимеризации ДНК, исследованные в работе [605].

Калориметрические данные, полученные на стадиях (2) и (3), позволили авторам определить полную энергию инкорпорирования нуклеотида в ДНК (ΔH_{pol} , ΔS_{pol} и ΔG_{pol}). На стадии (5) ими был определены энергетические эффекты присоединения нуклеотида к ДНК без образования фосфодиэфирной связи (ΔH_{bind} , ΔS_{bind} и ΔG_{bind}). Разница между этими величинами представляет собой сумму двух вкладов: энергии образования фосфодиэфирной связи и энергии, затрачиваемой на перемещение молекулы фермента на длину одного нуклеотида (последние два вклада в данной схеме эксперимента разделить не представляется возможным):

$$\Delta H_{\text{cstr}} = \Delta H_{\text{pol}} - \Delta H_{\text{bind}}$$

$$\Delta S_{\text{cstr}} = \Delta S_{\text{pol}} - \Delta S_{\text{bind}}$$

$$\Delta G_{\text{cstr}} = \Delta G_{\text{pol}} - \Delta G_{\text{bind}}$$

Все указанные энергетические эффекты, измеренные и рассчитанные авторами [604] для каждого из четырёх нуклеотидов, представлены графически на Рис. 10-7. Величины измеренной ими энтальпии инкорпорирования нуклеотида в ДНК, ΔH_{pol} , близки к значениям, полученным в обсуждавшейся выше работе [603].

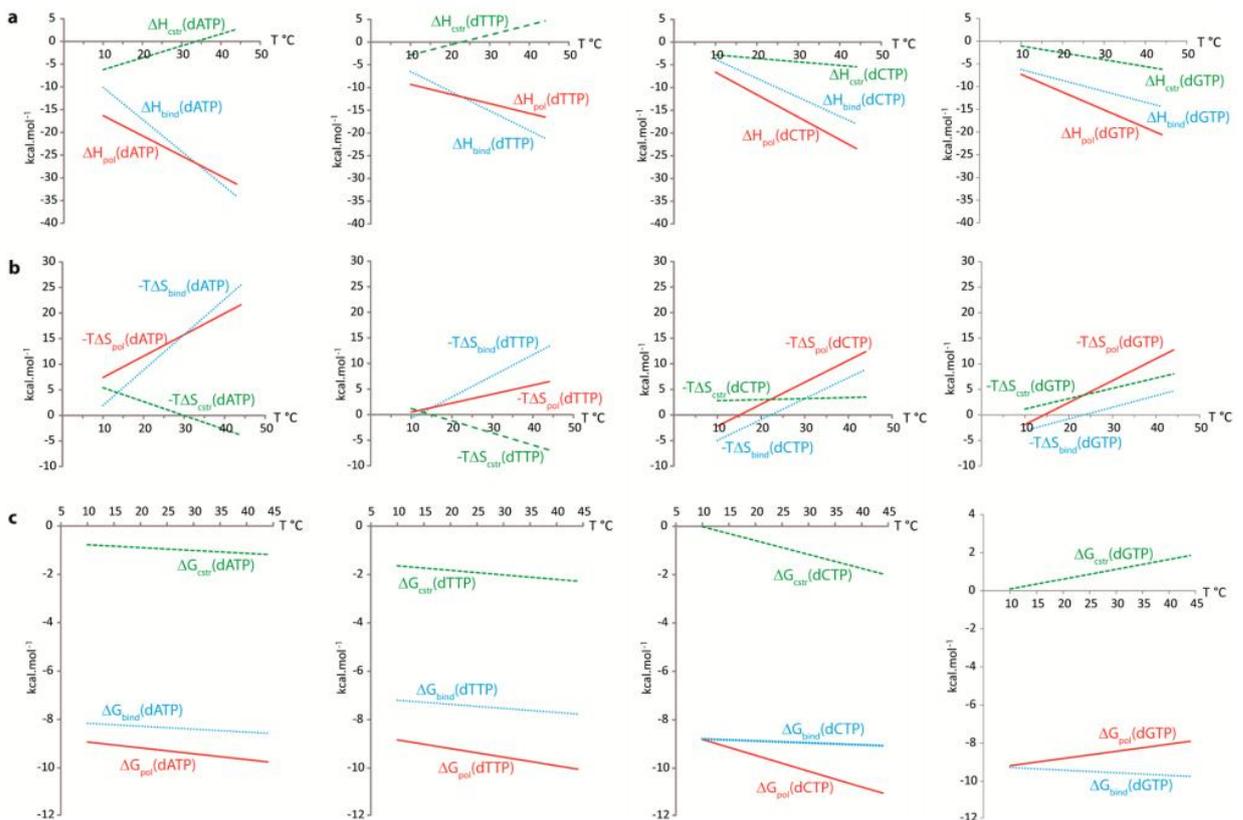


Figure 3. Thermodynamics of incoming nucleotide binding to RT/DNA complex. Temperature dependence of (a) ΔH , (b) $-T\Delta S$, and (c) ΔG are shown for incoming nucleotides dATP, dTTP, dCTP, and dGTP to the RT/DNA complex. Observed enthalpy, entropy, and Gibbs free energy changes for nucleotide initial binding only (ΔH_{bind} , $-T\Delta S_{bind}$, ΔG_{bind}) are represented with cyan dotted lines. Analogous parameters for overall nucleotide incorporation (ΔH_{pol} , $-T\Delta S_{pol}$, ΔG_{pol}) are represented with red solid bold lines. Deduced parameters for the chemical plus the translocation steps (ΔH_{cstr} , $-T\Delta S_{cstr}$, ΔG_{cstr}) are represented with green dashed lines. Experimental data are reported in Figure S12 and Tables S1 and S2 and were fitted with a linear least-squares regression.

Рис 10-7. Термодинамика связывания нуклеотидов с комплексом RT/DNA, состоящим из обратной транскриптазы (RT) и олигомера ДНК с «висячим» концом. Символами ΔH_{pol} , ΔS_{pol} и ΔG_{pol} обозначены энергетические эффекты инкорпорирования нуклеотида в ДНК. Символы ΔH_{bind} , ΔS_{bind} и ΔG_{bind} обозначают соответствующие эффекты присоединения нуклеотида к ДНК без образования фосфодиэфирной связи. Разница между этими величинами (ΔH_{cstr} , ΔS_{cstr} и ΔG_{cstr}) представляет собой сумму энергии образования фосфодиэфирной связи с энергией перемещения RT на длину одного нуклеотида. Из работы [604].

Как можно видеть в графе С на Рис. 10-7, найденное значение ΔG_{cstr} имеет небольшую отрицательную величину в случае, когда азотистое основание представлено аденином, тиминном или цитозином, и столь же небольшую положительную величину в случае гуанина. Тем самым, по крайней мере для трёх нуклеотидов фосфодиэфирная связь термодинамически стабильна по отношению к гидролизу, если предположить, что перемещение RT по ДНК происходит с затратой энергии.

Механизм перемещения (translocation) полимеразы по ДНК до сих пор не был идентифицирован; источник энергии этого движения составляет одну из загадок энзимологии. В 1993 г. в статье [606] был предложен механизм, согласно которому перемещения полимеразы осуществляется за счёт энергии броуновского движения вследствие того, что полимеразы способна перемещаться по ДНК лишь в одном направлении. Предложенный механизм (т.н. *Brownian ratchet*, храповик-собачка) снискал популярность среди биохимиков и биофизиков. Были опубликованы многочисленные его детализации и уточнения, основанные на моделировании различных полимераз методами молекулярной динамики, с привлечением рентгеноструктурных данных. По существу, механизм, именуемый *the Brownian ratchet*, ныне стал общепризнанным, хотя, строго говоря, его пока нельзя считать доказанным. Осуществимость подобного механизма,

отметим, предполагает наличие у полимеразы свойств вечного двигателя второго рода, в котором нарушается второе начало термодинамики.

Если перемещение полимеразы по ДНК действительно осуществляется по механизму *the Brownian ratchet*, без затрат энергии, то полученные в работе [604] величины ΔH_{cst} , ΔS_{cst} и ΔG_{cst} следует считать оценками энергии образования фосфодиэфирной связи. Если же какая-то часть энергии гидролиза нуклеозидтрифосфата затрачивается на перемещение РТ, то фосфодиэфирную связь следует считать чуть более стабильной. В любом случае свободная энергия образования/гидролиза фосфодиэфирной связи близка к нулю. Этот вывод, основанный на новейших данных калориметрии, согласуется со всеми более ранними оценками, в том числе тех, что основаны на замерах констант реакций.

Отличие энергетики энзиматической полимеризации от полимеризации стемпингом.

Имеется одна важная особенность полимеризации на основе, существенным образом отличающая её от полимеризации энзиматической. В процессе сборки ДНК и РНК, осуществляемой полимеразы, нуклеотиды, изначально присутствующие в растворе, притягиваются к макромолекуле и утрачивают подвижность. Утрата подвижности молекулой приводит к уменьшению энтропии системы. Если же соединение нуклеотидов фосфодиэфирным связями имеет место в процессе стемпинга, нуклеотиды изначально зафиксированы на поверхности основы. Та же реакция образования фосфодиэфирной связи, поэтому, в последнем случае не имеет «энтропийного пениальти». В результате полинуклеотиды, фиксированные на поверхности основы, приобретают некоторую дополнительную термодинамическую устойчивость к гидролизу, отсутствующую у полинуклеотидов в растворе.

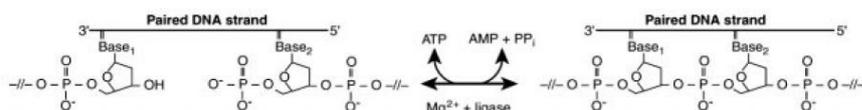


Рис 10-8. Схема действия ДНК лигазы Т4, использованной в [607].

Для оценки соответствующего энтропийного вклада можно воспользоваться данными сравнительного исследования полимераз и лигаз, выполненного в [607]. Фермент лигаза устраняет односторонний разрыв в двухцепочечной ДНК, используя для этого энергию АТФ или НАД⁺. При одностороннем разрыве фосфодиэфирной связи в ДНК разрушения уотсон-криковских пар не происходит, поэтому сравнивая ΔG реакции починки фосфодиэфирной связи ДНК лигазой с ΔG реакции присоединения нуклеотида к ДНК полимеразой, в принципе, можно оценить величину энтропийного пениальти. Такая оценка была получена в работе [607].

Авторы [607] исследовали термодинамику реакции сшивания одностороннего разрыва фосфодиэфирной связи в кольцевой ДНК, катализируемой ДНК-лигазой Т4. Схема реакции показана на Рис. 10-8. Одна из особенностей этого фермента в том, что он действует обратимо, и это позволяет использовать его для определения константы реакции. Из данных, представленных в [607] следует, что «энтропийное пениальти» возникающее за счёт утраты нуклеотидом подвижности, составляет 3.8 kcal/mol.

Наличие «энтропийного пениальти» свидетельствует, что фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах, фиксированных в апатитовой основе, должны быть стабильнее, нежели аналогичные связи в свободных молекулах. Поскольку ΔG реакции гидролиза фосфодиэфирных связей в ДНК, измеренные калориметрически с использованием полимераз, близки к нулю (см выше), полученная в [607] оценка «энтропийного пениальти» показывает, что фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах, фиксированных в основе, должны быть термодинамически стабильны. Интуитивно, полученная в [607] величина «энтропийного пениальти» представляется несколько завышенной. Дополнительный выигрыш свободной энергии мог возникнуть, например, за счёт энергии скручивания двойной спирали ДНК, используемой лигазой помимо энергии АТФ. Тем самым,

фосфодиэфирные мостики, соединяющие нуклеотиды, притянутые основой, могут возникать самопроизвольно при стемпинге при наличии подходящего катализатора. Однако, в отсутствие независимых оценок величины «энтропийного пены», вопрос о том, будет ли степень стабилизации фосфодиэфирных связей достаточной для их образования, остаётся открытым.

10.1.3. Предварительное обсуждение.

Экспериментальные данные о термодинамических свойствах нуклеиновых кислот, изложенные в данном разделе, позволяют сделать несколько практически важных выводов. Первый вывод заключается в том, что нуклеозид- 3'-монофосфаты и нуклеозид-5'-монофосфаты имеют очень близкие энтальпии образования и поэтому их можно считать термодинамически эквивалентными. Данные, полученные для нуклеозид- 3'-монофосфатов можно переносить на соответствующие 5'-монофосфаты.

Следующий вывод состоит в констатации того, что энтальпия и свободная энергия гидролиза фосфодиэфирной связи в двухцепочечных полинуклеотидах близка к нулю. С термодинамической точки зрения, полинуклеотиды «почти стабильны» по отношению к гидролизу фосфодиэфирной связи при физиологических условиях. Поэтому существует возможность более глубокой стабилизации этой связи, достаточной для спонтанного её образования при стемпинге, если будет найден параметр, изменением которого можно добиться дальнейшего уменьшения величины свободной энергии этих связей.

Ещё один вывод состоит в том, что фосфодиэфирная связь в нуклеозидциклофосфатах в термодинамическом отношении менее стабильна, чем аналогичная связь в полинуклеотидах. В самом деле, свободная энергия и энтальпия гидролиза фосфодиэфирной связи в полинуклеотидах близка к нулю, тогда как гидролиз нуклеозидциклофосфатов протекает экзотермически (Таблица 10-2). Возникающего избытка свободной энергии должно быть достаточно для спонтанного образования полинуклеотидов из нуклеозидциклофосфатов при условии, что реакция гидролиза фосфодиэфирной связи подавлена тем или иным способом.

Более того, фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах, адсорбированных основой, стабильнее по отношению к гидролизу, нежели аналогичные связи растворённых полинуклеотидов. Вследствие фиксации нуклеотидов основой, энтропийный эффект гидролиза адсорбированного полинуклеотида ниже, чем у растворённого. Если оценка «энтропийного пены» (3.8 kcal/mol), полученная в работе [607], верна, адсорбированные апатитом полинуклеотиды должны быть устойчивы по отношению к гидролизу даже при физиологических условиях. Тем самым, оказывается возможной и спонтанная полимеризация нуклеозидциклофосфатов с образованием линейных полинуклеотидов, если эти циклофосфаты адсорбированы апатитовой основой.

Поскольку в нашем распоряжении нет независимых оценок «энтропийного пены», не может быть полной уверенности и в осуществимости синтеза полинуклеотидов из нуклеозидциклофосфатов. В этих условиях представляется целесообразным рассмотреть имеющиеся сведения о воздействии температуры, состава раствора и давления на устойчивость фосфодиэфирных связей в поисках путей дальнейшей их стабилизации.

10.2. Влияние температуры.

Образование фосфодиэфирной связи сопровождается высвобождением молекул воды, поэтому вклад энтропии в стабилизацию этой связи должен увеличиться при повышении температуры. Повышение температуры не должно приводить к десорбции нуклеотидов с поверхности апатитового кристалла, однако, во избежание нарушений водородных связей и стэкинга, температуру эксперимента не следует поднимать выше 60-80° С. Остаётся

неясным, достаточно ли такого повышения температуры для стабилизации фосфодиэфирной связи, но, интуитивно, это кажется маловероятным.

10.3. Влияние катионов и pH.

РНК и ДНК являются полианионами. Отрицательный заряд, несомый фосфатными группами, компенсируется зарядом противоионов – катионов металла, водорода или аминогрупп, присутствующих в растворе. Очевидно, противоионы должны как то влиять на фосфатные группы и тем самым на устойчивость фосфодиэфирных связей, но в моём распоряжении нет никаких данных о характере этого влияния. При всём обилии публикаций о влиянии pH и концентрации Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} и других ионов на кинетику разрыва фосфодиэфирной связи различными ферментами и рибозимами, мне не известно ни одного исследования влияния этих свойств на соответствующие константы равновесия.

В целом, стабилизация фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах при повышенных концентрациях солей представляется маловероятной, хотя имеющиеся данные и не позволяют исключить возможность такого явления. Тем не менее, для практического осуществления полимеризации нуклеотидов важно знать, как вариации солевого состава растворов влияют на нековалентные взаимодействия в полинуклеотидах. Необходимость создания высоких концентраций электролитов и некоторых солей в процессах стемпинга может возникнуть для обеспечения связывания нуклеотидов с основой и для поддержания каталитической активности. Данные о влиянии солей на нековалентные взаимодействия в полинуклеотидах приводятся ниже.

Установлено, что трёхмерная структура ДНК и РНК может претерпевать значительные изменения при повышении концентрации ряда катионов. Хотя такие превращения и не затрагивают структуры ковалентных связей в полинуклеотидах, в том числе и фосфодиэфирных, их важно учитывать, так как они способны повлиять на адсорбцию полинуклеотидов основой. Выше (раздел 7.1) уже обсуждалась возможность трансформации В-ДНК в Z- или А-ДНК при повышенных концентрациях солей. Кроме того РНК сворачивается в плотную глобулу при повышенных концентрациях двухвалентных катионов, в особенности Mg^{2+} . Исследованию этого явления посвящена обширная литература, цитируемая, например, в [609].

Судя по имеющимся структурным данным, повышенные концентрации щелочных и щелочноземельных катионов не сказываются существенным образом на свойствах уотсон-криковских пар. Например, в работе [608] были расшифрованы структуры кристаллов кальциевых и магниевых солей олигомеров ДНК. Высокое совершенство выращенных кристаллов позволило авторам локализовать ионы металлов в структуре. Данная работа – один из немногих примеров расшифровки структуры полинуклеотида, в котором локализованы все катионы. Как локализация, так и координационные сферы ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в указанных структурах оказались различными, однако расстояние между азотистыми основаниями нуклеотидами и другие параметры ДНК в них очень близки к таковым обычной В-ДНК в растворе солей одновалентных металлов.

Ещё одно изменение трёхмерной структуры – возникновение G-квадруплексов – имеет место в обогащённых гуанином участках ДНК при повышенных концентрациях ряда одно- и двухвалентных катионов. Подробно это превращение, потенциально способное воспрепятствовать правильной адсорбции одноцепочечных полинуклеотидов основой при стемпинге, обсуждается ниже, в разделе 10.4.2. Здесь достаточно будет упомянуть, что, согласно [610], возникновению G-квадруплексов способствуют такие ионы, как K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Sr^+ и Ba^+ , с ионным радиусом в диапазоне 1.3 – 1.5 Å, тогда как в присутствии катионов с меньшим ионным радиусом, таких как Li^+ , Na^+ , Cs^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} , G-квадруплексы характеризуются низкой устойчивостью. В процессе синтеза

полинуклеотидов может возникнуть необходимость поддержания высоких концентраций таких катионов, как Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} или Zn^{2+} . Поскольку ионный радиус этих катионов не превосходит 1 \AA , высокие их концентрации к стабилизации G-квадруплексов приводить не должны.

Имеется ещё одно структурное превращение в ДНК под действием некоторых одно- и двухвалентных катионов, пока малоизученное, возможность которого следует иметь в виду при осуществлении экспериментов по абиогенной полимеризации нуклеотидов. При концентрации ряда катионов, таких как Zn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} , выше 1 Mm и pH выше 8, имеет место связывание их с ДНК. При этом образуется новая структурная разновидность, получившая название М-ДНК, [611]. Предполагается, что ион металла помещается посередине уотсон-криковских пар, замещая протоны иминогрупп, участвующих в образовании водородных связей, Рис. 10-9.

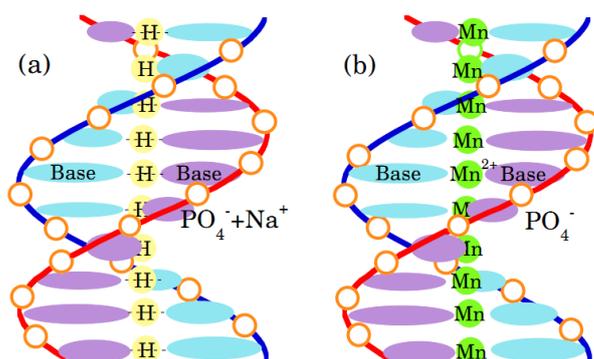


Рис 10-9. Схематическое изображение В- ДНК и М-ДНК. Авторы [611] предполагают, что ионы металла располагаются между азотистыми основаниями, замещая протоны иминогрупп, участвующие в образовании водородных связей. Из работы [612].

В отличие от В-ДНК, М-ДНК не образует интеркалятов с этидием. В спектрах ЯМР такой ДНК отсутствует сигнал от протонов иминогрупп. Структура В-ДНК восстанавливается при добавлении ЭДТА, и это доказывает, что в М-ДНК сохраняется структура двойной спирали с антипараллельной ориентацией цепочек. Хотя вопрос о природе М-ДНК и роли двухвалентных катионов в её структуре не решён окончательно, считается, что ковалентные связи в ней такие же, как В-ДНК, [613]. Тем самым, повышенные концентрации Zn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} могут привести к изменению взаимодействий между основаниями в уотсон-криковских парах, но не окажут влияния на фосфодиэфирные связи.

10.4. Влияние активности воды.

Реакция образования фосфодиэфирной связи включает в себя выделение молекулы воды, поэтому снижение активности воды в растворе, согласно принципу Ле Шателье, должно способствовать термодинамической стабилизации фосфодиэфирной связи. Контролируемого снижения активности H_2O можно добиться, добавляя в раствор инертные растворители, например метанол или полиэтиленгликоль. Если в опытах понизить химический потенциал H_2O до уровня, когда гидролиз фосфодиэфирных связей заблокирован, можно было бы попытаться осуществить полимеризацию нуклеотидов путём переэтерификации, используя нуклеозидциклофосфаты в качестве исходных компонентов. Выше было показано, что фосфодиэфирная связь в линейных полинуклеотидах в термодинамическом отношении стабильнее этой же связи в

циклофосфатах, поэтому реакция полимеризации должна протекать спонтанно при наличии подходящего катализатора.

Важно отметить, что возможность некоторой стабилизации фосфодиэфирной связи за счёт уменьшения активности воды в системе была продемонстрирована экспериментально автором диссертации [512]. Данный автор исследовал поведение 3'-GMP и 3'-CMP в смесях воды с метанолом и этиленгликолем в присутствии ферментов RNase A и RNase T₁ (см. выше, раздел 9.1.1). Указанные ферменты катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей. Принято считать, что гидролиз протекает необратимо, однако в [512] было показано, что катализируемая реакция становится обратимой при разведении раствора спиртами. Согласно этим данным, выдерживание 3'-GMP в 40%-ном растворе метанола в присутствии RNase A приводит к появлению небольшого количества 2',3'-GMP. Похожие результаты получены для 3'-CMP. Выдерживание последнего в смеси воды с метанолом в присутствии того же катализатора привело к появлению циклического 2',3'-CMP в растворе. Сходным образом, образование 2',3'-GMP посредством циклизации 3'-GMP было зафиксировано в растворе этиленгликоля в присутствии RNase T₁. В водных растворах (т.е. в отсутствие спиртов) указанные реакции не идут, очевидно, вследствие слишком высокой активности H₂O.

Хотя данные диссертации [512] доказывают принципиальную возможность некоторой стабилизации фосфодиэфирных связей в результате снижения активности H₂O при добавлении инертных органических соединений в раствор, вопрос о степени достигаемой стабилизации остаётся открытым. Зафиксированные концентрации образующихся 2',3'-GMP и 2',3'-CMP были низкими. В то же время, снижение активности воды в растворе, необходимое для предотвращения гидролиза фосфодиэфирных связей, может привести к нарушениям в структуре синтезируемых полинуклеотидов.

Имеются серьёзные основания полагать, что молекулы воды являются важным структурообразующим элементом полинуклеотидов. Нековалентные взаимодействия в них осуществляются с участием молекул воды. Поэтому регулировать активность воды в опытах следует с большой осторожностью. Ниже дан очень краткий обзор структурных данных о молекулах воды, образующих т.н. гидратированный слой ДНК и РНК. Затем приводятся имеющиеся сведения об участии молекул воды в формировании структуры двухцепочечных спиралей полинуклеотидов, в образовании уотсон-криковских пар, хугстиновских пар и интеркалятов.

10.4. 1. Структурообразующая роль воды в полинуклеотидах.

Ранее всюду термин *гидратированный слой* нами использовался лишь применительно к кристаллическим фазам: апатиту и ОСР. Это был либо гидратированный слой в структуре ОСР, либо структурно родственный ему слой, локализующийся в области контакта апатита с водой. В биохимической литературе тот же термин (*the hydration layer* или *the hydration shell*) используется при изучении растворов макромолекул, главным образом полинуклеотидов и полипептидов. Так называют слой молекул воды, непосредственно контактирующих с биологической макромолекулой, часто обнаруживающих необычные свойства.

В последние десятилетия изучение гидратации ДНК и РНК выделилось в самостоятельную область исследований. Методами структурной кристаллографии и спектроскопии ЯМР установлено, что молекулы воды, окружающие полинуклеотиды, имеют необычную структуру.

Прогресс в понимании структурных особенностей воды, окружающей молекулы полинуклеотидов, в значительной мере обусловлен рентгенографическим исследованием кристаллов синтетических олигомеров ДНК, РНК и молекул природной тРНК. В отличие от катионов, как правило, не имеющих локализованных позиций в кристаллах полинуклеотидов и потому не образующих чётких дифракционных максимумов, часть молекул воды в кристаллах ДНК и РНК связывается с атомами кислорода и азота

нуклеиновых кислот и удерживается в определённых позициях структуры достаточно длительное время. На картах электронной плотности такие молекулы выглядят, как если бы они были притянуты к полинуклеотиду ковалентными связями, [614].

Рентгенографические исследования позволяют локализовать около половины молекул воды содержащихся в кристаллах ДНК, [615]; в РНК доля таких молекул ниже (а кристаллы РНК содержат до 75% H_2O). В целом, для идентифицированных структурных форм воды в ДНК и РНК характерен высокий полиморфизм. Высказывались предположения, что рентгенографические данные являются чем-то вроде моментальной фотографии динамически сменяющихся друг друга конфигураций молекул воды, окружающих молекулу полинуклеотида в растворе, [614].

Чаще всего молекулы H_2O образуют связи с нестиковым кислородом фосфатных групп, примерно вдвое реже с атомами кислорода $O(4')$ рибозы и ещё реже – с атомами кислорода $O(3')$ и $O(5')$, участвующими в образовании фосфодиэфирной связи.

Молекулы H_2O могут образовывать мостиковые соединения между двумя атомами одного нуклеотида, двух примыкающих нуклеотидов одной цепи или более удалённых нуклеотидов из разных цепей. Внутри нуклеотида мостиковые соединения чаще всего наблюдаются между атомами $N(7)$ и $O(6)$ (или $N(6)$) пуриновых оснований и между $N(2)$ и $N(3)$ гуанина. В большой бороздке А- и В-форм обычны мостики, состоящие из двух связанных молекул воды, соединяющие гидрофильные атомы как из одной цепи, так и из соседних цепей, [614]. На участках А-формы с чередующимися основаниями А-Т такие мостики из двух молекул H_2O могут объединяться в пятиугольные кластеры, заполняющие большую бороздку. Поскольку рисунок молекул воды в больших бороздках обнаруживает значительный полиморфизм и вариативность, принято считать, что эти молекулы не играют структурообразующей роли. В то же время не вызывает сомнений структурообразующая роль молекул H_2O , всегда обнаруживаемых в малой бороздке А-, В- и Z-форм.

Расположение молекул H_2O в малой бороздке полинуклеотида обычно обнаруживает периодичность, согласующуюся с периодичностью двойной спирали. В В-ДНК атомы $N(3)$ и $O(2)$ на участках, богатых основаниями А и Т, соединяются цепочками из молекул воды, образующими т.н. *spine of hydration*, Рис. 10-11. Методами спектроскопии ЯМР установлено наличие аналогичного *spine of hydration* у В-ДНК, растворённой в воде, [593, 614]. В малой бороздке Z-ДНК аналогичная цепь образуется из молекул воды, соединяющих атомы $O(2)$, [614]. Присутствие гуанина приводит к локальным нарушениям в *spine of hydration* у В-ДНК, в то время как в Z-ДНК присутствие аденина приводит к локальному нарушению связности водяной цепочки. Помимо *the spine of hydration*, в малой бороздке В-ДНК часто обнаруживаются ленты из сдвоенных молекул H_2O , образующих водородные связи с атомами кислорода рибоз, [593].

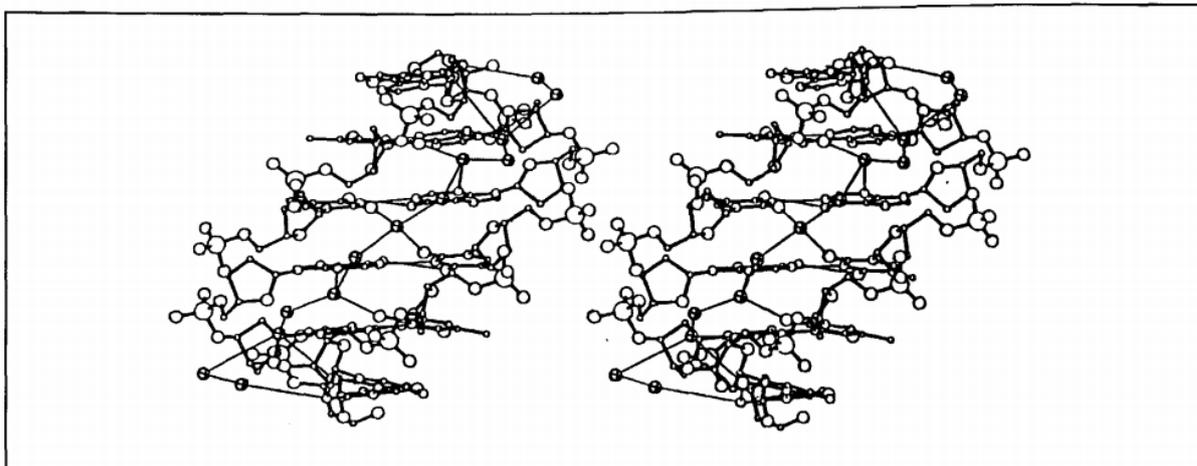


Рис 10-11. Стереоскопическое изображение тяжа из молекул воды (*the spine of hydration*) обнаруживаемого в кристаллах додекамера $d(CGCGAATTCGCG)_2$ со структурой В-спирали. Из обзора [464].

Одно из основных структурных различий между А-, В- и Z-формами полинуклеотидов заключается в том, что их фосфатные группы по-разному взаимодействуют с молекулами H_2O . Во всех трёх типах полинуклеотидов молекулы воды образуют водородные связи с немостиковыми кислородами фосфатных групп. Однако в А- и Z-формах молекулы H_2O образуют мостики, соединяющие соседние фосфатные группы одной цепочки. Подобные мостики могут образоваться лишь в этих двух формах ввиду меньшего расстояния между фосфатными группами. В то же время в В-форме молекулы H_2O соединяют немостиковый атом кислорода фосфатной группы с участвующим в образовании фосфодиэфирной связи атомом $O(5')$ при той же фосфатной группе, [614]. Кроме того, во всех трёх формах наблюдаются мостики и тяжи (*strings* или *filaments*) из молекул воды, соединённые с немостиковыми кислородами фосфатов, простирающиеся от одной полинуклеотидной цепочки до другой. В тРНК такие тяжи простираются на длину четырёх – пяти нуклеотидных остатков.

Выше, в главе 4 была предложена модель возникновения двухцепочечных полинуклеотидов в природе в результате спонтанно осуществившегося стемпинга кристаллов апатита. Далее, в главе 6 был сделан вывод о связи этого явления с гидратированным слоем апатита, сообщаящего апатиту способность адсорбировать нуклеиновые кислоты. Одна из особенностей гидратированного слоя апатита состоит в присутствии в нём большого количества молекул воды. Не исключено, что гидратированный слой у растворённых в воде молекул ДНК и РНК представляет собой подобие гидратированного слоя апатита. Фосфатные группы полинуклеотидов воссоздают вокруг себя подобие среды, в которой они когда-то возникли. Так ли это на самом деле, или нет, судить, конечно, трудно. Тем не менее, термодинамические данные, поставляющие усреднённые характеристики молекул, свидетельствуют, что вода гидратированного слоя полинуклеотидов обладает необычными свойствами, прежде всего высокой плотностью, превосходящей плотность жидкой воды.

10.4.2. Участие молекул воды в нековалентных взаимодействиях в полинуклеотидах.

Количество молекул воды, покидающих молекулы полинуклеотида или связывающихся с ней в том или ином превращении, может быть определено методами химической термодинамики. В получившем широкое распространение методе *осмотического сдавливания* (*osmotic stress technique* или *osmotic pressuring*), количество молекул H_2O высвобождаемых или присоединяемых молекулой полинуклеотида вследствие той или иной реакции определяют из данных о зависимости константы реакции от активности воды. Активность воды регулируют, добавляя в раствор

электронейтральные соединения, хорошо смешивающиеся с водой, такие как полиэтиленгликоль (PEG), декстран, поливинилпироллидон и другие.

Термодинамический формализм метода осмотического сдавливания представлен в работах [618, 619]. В методе постулируется, что молекулы добавляемого инертного соединения не взаимодействуют непосредственно с исследуемой макромолекулой (полинуклеотидом). Предполагается, что добавляемое соединение отторгается слоем молекул воды, окружающих полинуклеотид. В результате создаётся осмотическое давление, оттягивающее молекулы H_2O с поверхности полинуклеотида.

Оценки числа высвобождаемых при реакциях молекул H_2O , определённые методом осмотического сдавливания, иногда варьируют в зависимости от используемого растворителя, свидетельствуя о невыполнении основного постулата теории. Наилучшее соответствие теории с практикой наблюдается при разведении раствора небольшими электронейтральными молекулами. В то же время, влияние размера молекулы добавляемого растворителя довольно успешно описывается в рамках т.н. *excluded volume theory*. Одно из неожиданных предсказаний этой теории, подтверждаемое практикой, состоит в том, что в области малых концентраций разведение раствора крупными макромолекулами должно сопровождаться не уменьшением, а увеличением активности H_2O , [620].

Влияние активности H_2O на трёхмерную структуру полинуклеотидов. Уменьшение активности воды может привести к изменению трёхмерной структуры полинуклеотида. В работе [464], например, для poly(dGdC) зафиксирован переход В-формы в Z-форму при добавлении в раствор одноатомных и двухатомных спиртов, сахарозы, некоторых олигосахаридов. В работе [621] обнаружено изменение структуры глобулы РНК в растворе при уменьшении активности H_2O , вызванном добавлением PEG (400 Da) или декстрана (12 000 Da). Молекулы сходного химизма, но меньшего размера, такие как сахароза и глицерин, подобного действия не оказывают.

Влияние активности воды на устойчивость уотсон-криковских пар и соблюдение принципа комплементарности. Согласно данным рентгеноструктурных исследований, в молекулах двухцепочечных ДНК и РНК часто обнаруживаются молекулы воды, образующие водородные связи с фосфатными группами и азотистыми основаниями нуклеотидов, предположительно, способствующих упрочнению двойных спиралей. Если последнее предположение верно, добавление в раствор низкомолекулярных инертных соединений, сопровождающееся уменьшением активности H_2O , должно приводить к дестабилизации уотсон-криковских пар и понижению температуры денатурации полинуклеотидов (T_m), а добавление высокомолекулярных соединений, повышая активность H_2O , должно приводить к дополнительной стабилизации уотсон-криковских пар и повышению T_m . Экспериментальные замеры величины T_m полинуклеотидов в смесях воды с различными спиртами и углеводами действительно обнаруживают эту тенденцию.

Значения T_m , определённые для образцов природной ДНК различного происхождения, полимеров ДНК poly[d(A-T)·d(A-T)] и [poly(dA)·poly(dT)], полимера РНК [poly(I)·poly(C)], синтетических олигомеров ДНК и РНК различной длины, в том числе метилированных, всегда демонстрируют сходные тенденции. Величина T_m понижается на несколько градусов при добавлении в раствор компонентов небольшой молекулярной массы, таких как глюкоза, сахароза, раффиноза, метанол, глицерин, этиленгликоль (мономер и PEG вплоть до 200 Da). Величина T_m повышается, в максимуме на 15 - 20° С, если добавляемый компонент имеет высокую молекулярную массу, например PEG 400 – 6000 Da или декстран 80-500 Da, [620, 622, 623, 624]. Аналогичное поведение обнаруживают различные олигомеры одноцепочечной ДНК способные складываться с образованием шпильчатой структуры (возникающей за счёт образования уотсон-

криковских пар), [625]. Сходные тенденции обнаруживаются также и при исследовании диссоциации трехцепочечной ДНК, [623].

В качестве иллюстрации, на Рис. 10-12 показано изменение температуры диссоциации трехцепочечной ДНК (А) и денатурации двухцепочечной ДНК (В, С) при добавлении в раствор этиленгликоля и PEG с молекулярной массой от 400 до 8000 Da. Две противоположные тенденции, когда инертные компоненты с малой молекулярной массой дестабилизируют, а большой – стабилизируют уотсон-криковские пары, хорошо видны на графиках. Обе тенденции количественно теоретически объясняются в рамках упоминавшейся выше *excluded volume theory*, [620]. Согласно полученным оценкам, денатурация ДНК сопровождается высвобождением четырёх молекул H₂O на каждую пару нуклеотидов, [623]. Количество молекул H₂O, высвобождаемых при денатурации коротких олигомеров ДНК, ниже – порядка двух-трёх молекул на пару нуклеотидов, [624]. Уровень гидратации РНК выше чем у ДНК, и при денатурации РНК выделяется на одну-две молекулы H₂O больше (на каждую пару нуклеотидов), [624].

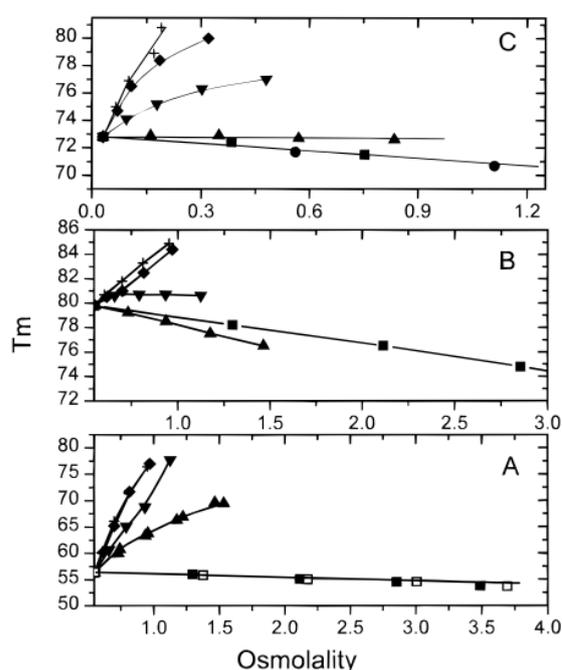


FIGURE 3: Melting temperatures at different osmolalities for (A) triplex poly(dT)·poly(dA)·poly(dT) DNA in solutions of cosolutes, (■ and □) ethylene glycol, (▲) PEG 400, (▼) PEG 1000, (◆) PEG 3400, and (+) PEG 8000, (B) duplex poly(dA)·poly(dT) DNA in solutions of cosolutes (symbols like those described for panel A), and (C) duplex *E. coli* DNA in solutions of cosolutes, (●) glycerol (other symbols like those described for panel A).

Рис 10-12. Влияние осмотического давления на температуру диссоциации ДНК: (А) диссоциация трехцепочечной ДНК на двухцепочечную и одноцепочечную; (В, С) денатурация двухцепочечной ДНК. Из работы [623].

Как ясно из вышеизложенного, снижение активности H₂O действительно сопровождается некоторой дестабилизацией уотсон-криковских пар, однако дестабилизирующее воздействие невелико: даже в области высоких концентраций спирта T_m понижается лишь на несколько градусов.

Ещё один аспект влияния гидратации на уотсон-криковские пары был выявлен при исследовании структуры кристаллов олигомеров ДНК и молекул тРНК с нарушениями принципа комплементарности между цепями (т.н. *mismatches*), т.е., содержащими пары С·А, Т·G и G·А вместо обычных уотсон-криковских пар Т·А и С·G. В структуре таких кристаллов вблизи необычных пар нуклеотидов, нарушающих принцип

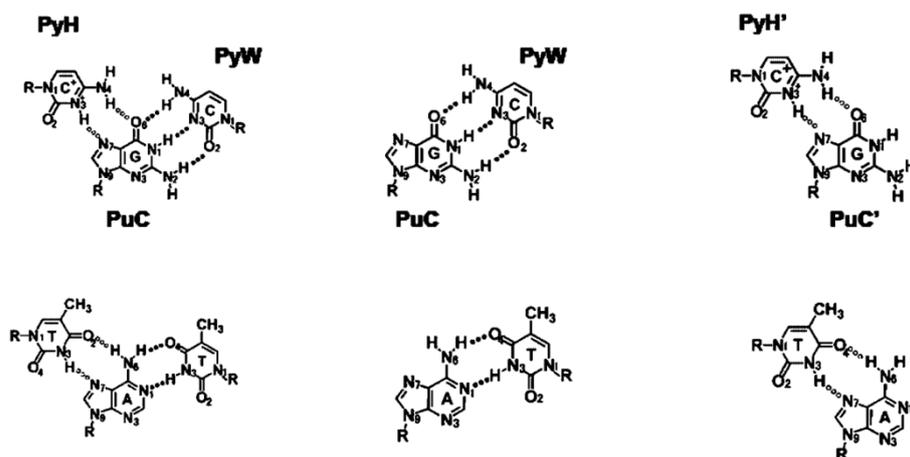


Рис 10-14. Структура водородных связей в хугстиновских парах (показанных незалитыми кружками) и уотсон-криковских парах (залитые кружки) в трёхцепочечной ДНК, ДНК из двух антипараллельных цепочек и ДНК из двух параллельных цепочек полинуклеотидов. *Из работы [628].*

О влиянии активности воды на устойчивость хугстиновских пар можно судить с большей уверенностью, потому что их термодинамические свойства к настоящему времени исследованы достаточно детально. Молекулы ДНК, содержащие хугстиновские пары, могут состоять из трёх цепочек полинуклеотидов или двух параллельно расположенных цепочек. Структура водородных связей в парах, удерживающих цепочки вместе, показана на Рис. 10-14. Кроме того, хугстиновские пары стабилизируют т.н. *G-квартуплексы*. Так называют обогащённые гуанином участки ДНК, собранные в четырёхцепочечные спирали, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую водородными связями хугстиновских пар, Рис. 10-15. В центре *G*-квартета располагается одновалентный катион, координируемый кислородами Об карбонильных групп гуанинов. В природе это обычно K^+ , в лабораторных условиях получены также *G*-квартуплексы с ионами Na^+ , NH_4^+ , [629]. *G*-квартуплексы могут быть как гомо-, так и гетеромолекулярными структурами.

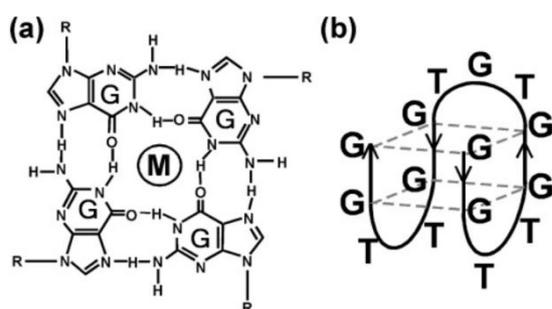


Рис 10-15. (а) Структура химических связей в *G*-квартете. Символом *M* обозначен одновалентный катион в центре квартета. (б) Пример *G*-квартуплекса из двух *G*-квартетов, образуемого изгибом одноцепочечной молекулы ДНК.

Детали структуры *G*-квартуплексов могут меняться в зависимости от вида и концентрации одновалентного катиона, нуклеотидов, следующих за последовательностью гуанозинов, концентрации олигомера и активности H_2O , [629,630]. Однако сравнительные их исследования не выявили чёткой связи особенностей структуры с устойчивостью. Термодинамические свойства разнообразных *G*-квартуплексов оказались похожими, [630,631].

Возникновение *G*-квартуплексов нежелательно при осуществлении стемпинга, потому что эти структуры могут помешать правильной адсорбции одноцепочечного нуклеотида основой. Возникновение двухцепочечных полинуклеотидов, соединённых

хугстиновскими парами, показанными справа на Рис. 10-14, тоже представляет собой нежелательное явление. В то же время стабилизацию трёхцепочечных полинуклеотидов, подобных показанным слева на Рис. 10-14, скорее всего, следует считать явлением благоприятным. Трёхцепочечная ДНК представляет собой каноническую ДНК из двух антипараллельных цепочек, связанных уотсон-криковскими парами, к которой присоединена ещё одна цепочка, удерживаемая за счёт образования хугстиновских пар. Тем самым создаётся дополнительная стабилизация уотсон-криковских пар, весьма желательная для более точного соблюдения принципа комплементарности.

Данные о структуре кристаллических и растворённых форм G-квадруплексов, их термодинамике и волюметрических свойствах содержатся в статьях [630-632]. Подробные сведения о термодинамике олигомеров двухцепочечной и трёхцепочечной ДНК с хугстиновскими парами имеются в работах [628, 633,634] и содержащихся в них ссылках. Все исследователи приходят к заключению, что образование неканонических пар нуклеотидов указанного типа сопровождается дегидратацией полинуклеотида. Тем самым, снижение активности H_2O способствует стабилизации хугстиновских пар и G-квадруплексов. (Напомним, что уотсон-криковские пары обнаруживают противоположную тенденцию).

К этому следует добавить, что стабилизация хугстинговских пар при понижении активности H_2O имеет место не только при разведении воды инертными растворителями. В работе [635], например, показано, что в ионной жидкости, образующейся в растворе двуокислого фосфата холина, хугстиновские пары стабилизируются и становятся более устойчивыми, чем уотсон-криковские.

Влияние активности H_2O на устойчивость интеркалированных соединений. В реакциях интеркалирования ДНК или РНК, плоская ароматическая молекула помещается между двумя парами азотистых оснований нуклеотидов. При этом двойная спираль локально раскручивается, и это приводит к её удлинению примерно на 3.4 Å. Стэкинг является движущей силой взаимодействия. Два последовательных промежутка между парами нуклеотидов не могут быть одновременно заняты интеркалирующими молекулами, т.е. распределение молекул при интеркаляции подчиняется т.н. принципу исключения соседей (т.н. *neighbor-excluding principle*), [636]. Многие из реакций интеркалирования протекают с участием большого количества молекул H_2O и, следовательно, чувствительны к вариациям её активности.

Интеркалирование ДНК пятью соединениями (этидий, пропидий, профлавин, дауномицин и 7-амино актиномицин D), показанных на Рис. 10-2 и Рис 10-16, было изучено методом осмотического сдавливания в работе [637]. Характер зависимости констант равновесия от осмотического давления (поддерживаемого сахарозой, бетаином и триэтиленгликолем) показал, что во всех случаях, кроме этидия, интеркалирование сопровождается присоединением молекул H_2O : шести молекул H_2O на каждую молекулу пропидия, восемнадцати – дауномицина, тридцати – профлавина и тридцати двух в случае 7-амино актиномицина D. Интеркалирование этидием осуществляется без присоединения или высвобождения молекул воды.

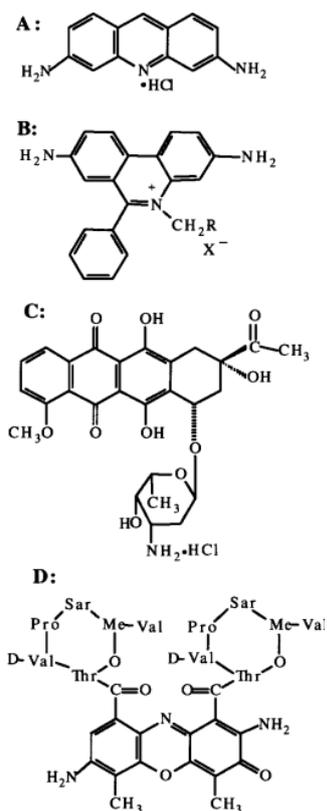
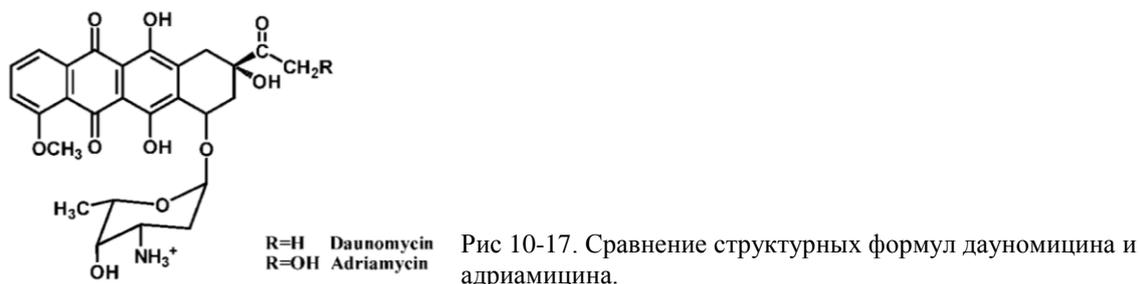


Рис 10-16. Структура пяти соединений, образующих интеркаляты в ДНК, исследованных в работе [637] методом осмотического сдвигания: (а) профлавина гидрохлорид; (b) этидия бромид ($R = \text{CH}_3$; $X = \text{Br}$) ($R = \text{CH}_2\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$; $X = 2\text{I}$); (c) дауномицин; (d) 7-амино актиномицин D.

Механизм реакции, сопровождающейся присоединением столь значительных количеств молекул воды, остаётся загадкой. Установлено, что в некоторых случаях небольшое изменение молекулы интеркалята может привести к существенному изменению количества связываемой воды. Пример такого поведения был обнаружен при сравнительном исследовании двух противоопухолевых антибиотиков из группы антрациклинов – уже упоминавшегося выше дауномицина и адриамицина, отличающегося от дауномицина лишь наличием одной дополнительной гидроксильной группы, Рис. 10-17. Интеркалированные соединения обеих молекул с ДНК практически изоструктурны. Однако комплекс адриамицина с ДНК намного прочнее и, согласно данным [638], образование его происходит с присоединением вдвое большего количества молекул H_2O .



Если стабилизация фосфодиэфирной связи посредством уменьшения активности воды окажется целесообразной при синтезе полинуклеотидов стемпингом, и вместе с тем возникнет необходимость использования интеркалятов, сделать это можно, выбрав интеркалят, подобно этидию, соединяющийся с полинуклеотидами без участия молекул воды. В качестве альтернативы можно использовать интеркаляты в повышенных концентрациях. Значения концентраций могут быть рассчитаны из данных [637,638] о влиянии осмотического давления на соответствующие константы равновесия.

Обсуждение. Разведение водного раствора нейтральным растворителем действительно может привести к некоторой стабилизации фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах. Возможно, осуществление стемпинга в растворах низкомолекулярных спиртов или сахаров действительно приведёт к полимеризации нуклеотидов, но в этом не может быть полной уверенности. Нековалентные взаимодействия, задействованные в реакциях полимеризации нуклеотидов (стэкинг, образование уотсон-криковских пар, образование многих интеркалятов) осуществляются с присоединением молекул воды к полинуклеотиду. Нельзя исключить, что снижение активности воды нарушит протекание соответствующих реакций. Снижение активности воды также способно стабилизировать G-квадруплексы, возникновение которых нежелательно. Тем самым, перспективы использования нейтральных растворителей при полимеризации нуклеотидов стемпингом остаются неопределёнными.

10.5. Влияние гидростатического давления.

Возможность использовать давление для регулирования того или иного превращения определяется объёмным эффектом превращения, ΔV . Давление способствует протеканию превращения, если превращение сопровождается уменьшением объёма, $\Delta V < 0$, и препятствует, если объём увеличивается, $\Delta V > 0$. Превращения, испытываемые полинуклеотидами в растворах, часто сопровождаются значительным изменением их мольного объёма. Например, согласно данным [657], величины парциальных мольных объёмов ДНК из молоки лосося, а также искусственных двухцепочечных poly(dA)·poly(dT), poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)], Poly(A)·poly(U) при 1° С лежат в диапазоне 140-148 см³/mol. А величины, определённые аналогичным методом в [658] для poly(dA)·poly(dT), poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)], poly[d(G-C)]·poly[d(G-C)] и пяти образцов природной ДНК различного происхождения при 25° С, лежат в пределах 152-187 см³/mol. Причину разительного отличия объёмов (более 10 см³/mol) авторы [658] видят в том, что их замеры проводились при более высокой температуре. В действительности же данное значение теплового расширения является аномально высоким, отражающим некие необычные, специфические для полинуклеотидов особенности структуры.

Термодинамическое моделирование волюметрических данных для водных растворов полинуклеотидов позволят связать необычность их свойств с особенностями гидратированного слоя полинуклеотидов. Согласно имеющимся оценкам, молекулы H₂O, сосредоточенные в окружающем молекулу полинуклеотида слое толщиной порядка 4Å, в среднем образуют более прочные водородные связи с его фосфатными группами и азотистыми основаниями, чем с другими молекулами H₂O, [616]. На каждый нуклеотид приходится от 5 до 12 таких молекул H₂O [615]. В результате плотность этого слоя оказывается порядка 1.17 – 1.26 г/см³, т.е. значительно выше плотности жидкой воды. Сжимаемость этого слоя, наоборот, на 45-20 % ниже, чем в основной массе воды.

Наличие уплотнённого слоя молекул H₂O на поверхности ДНК недавно было также продемонстрировано методами рамановской спектроскопии, [617]: молекулы воды (около шести на нуклеотид) образуют более прочные водородные связями с полинуклеотидом, нежели с другими молекулами в жидкой воде. Связи эти на 0.3 Å короче, чем в жидкой воде.

В предшествующем разделе обсуждались реакции, сопровождающиеся присоединением молекул H₂O к молекуле полинуклеотида или же, наоборот, приводящие к высвобождению таких молекул. Отличительную особенность этих реакций составляет чувствительность их к активности воды в растворе. Поскольку присоединение молекул воды к молекуле полинуклеотида сопровождается уменьшением объёма, разумно предположить, что высокие давления будут способствовать протеканию реакций, сопровождающихся присоединением воды, и препятствовать трансформациям,

приводящим к высвобождению молекул воды. Приведённый ниже обзор имеющихся данных подтверждает, в целом, наличие такой тенденции, хотя случаются и исключения, обусловленные, вероятно, аномально высоким тепловым расширением гидратированного слоя.

К числу реакций, протеканию которых способствует повышение гидростатического давления, принадлежит и реакция полимеризации нуклеотидов. Однако, в отличие от других реакций, остаётся неясным, связано ли это с присоединением молекул воды, или нет.

10.5.1. Устойчивость структуры ДНК и РНК при высоком давлении.

Структура биополимеров может меняться под действием высоких давлений. Типичным примером такого поведения служат протеины, как правило, испытывающие денатурацию при повышенном давлении, даже при низкой температуре, [639]. Примечательно, что структура молекул двухцепочечных спиралей ДНК и РНК при высоких давлениях почти такая же, как и при физиологических условиях.

Исследование ИК-Фурье спектров и спектров флюоресценции одноцепочечной тРНК (tRNA^{Phe}) при давлении до 3 kbar не выявило каких-либо существенных изменений в структуре связей, [640]. Сходным образом, исследование Фурье ИК-спектров двухцепочечного полимера poly(dA)poly(dT) со структурой В-ДНК при давлении до 12 kbar, выполненное в работе [641], не выявило каких-либо перестроек структуры связей. Расшифровка спектров привела авторов к выводу, что высокие давления несколько усиливают стэкинг.

О сохранении структуры ДНК при высоких давлениях также свидетельствуют данные авторов [642], выполнивших уточнение структуры кристалла двухцепочечного олигомера А-ДНК d(GGTATACC) (цепочка, комплементарная себе самой) при 5.5, 10.9 и 13.9 kbar. Расшифровка структуры показала, что, по крайней мере, центральная часть олигомера сохраняет структуру А-ДНК. Не исключено, что на флангах олигомера развивается структура разупорядоченной В-спирали. Наложение структур при 1 atm. и 13.9 kbar., показанное на Рис. 10-18, наглядно демонстрирует, сколь мало меняется структура двойной спирали при высоком давлении. При увеличении давления на 10 kbar, согласно оценкам авторов, среднее расстояние между ближайшими азотистыми основаниями одной спирали уменьшается лишь на 0.15 Å (свидетельствуя о некотором усилении стэкинга). Одновременно водородные связи в уотсон-криковских парах укорачиваются на 0.04 Å; это, возможно, указывает на незначительное усиление водородных связей.

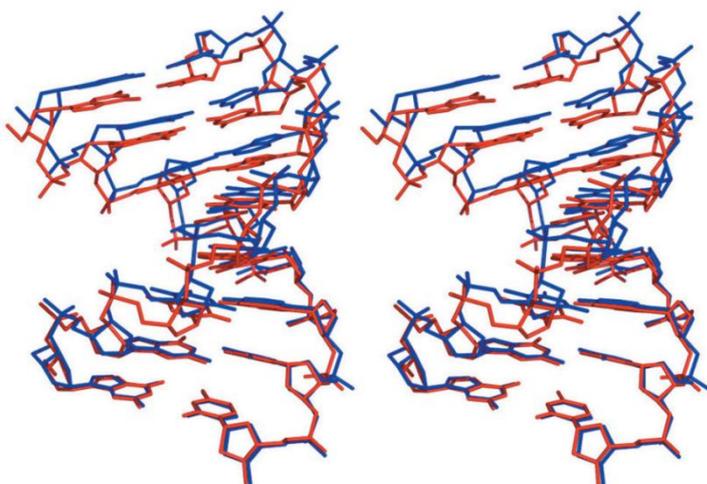


Рис 10-18. Наложение стереоскопических изображений структуры кристалла двухцепочечного олигомера А-ДНК d(GGTATACC) при 1 atm. (синее) и 13.9 kbar (красное). Из работы [642]

Похожие результаты были получены авторами [643], исследовавшими методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения структуру В-ДНК в водном растворе при давлении до 2 kbar. Объектом исследования был выбран олигомер

d(CTAGAGGAGATCCTUTTGGATCCT) со структурой шпильки. Авторы изучили спектры от нуклеотидов стебля шпильки, при атмосферном давлении имеющего конформацию В-ДНК. Структурные отличия, обнаруживаемые при повышенном давлении, тоже сводятся, главным образом, к небольшому укорочению водородных связей в уотсон-криковских парах. Кроме того, зафиксировано уширение малой бороздки, вероятно, свидетельствующее о переориентации присутствующих в ней молекул H₂O.

10.5.2. Влияние давления на устойчивость уотсон-криковских пар.

Упомянувшееся выше укорочение водородных связей в уотсон-криковских парах при высоких давлениях, обнаруженное для олигомеров А- и В-ДНК [643,642], свидетельствующее об усилении этого вида взаимодействий, является проявлением общей тенденции, выявляемой также при термодинамических исследованиях.

О степени стабилизирующего влияния давления на уотсон-криковские пары можно судить по величине объёмного эффекта денатурации двухцепочечного полинуклеотида, ΔV_{tr} . Оценки ΔV_{tr} , полученные авторами [639] по уравнению Клапейрона

$$dT_m/dP = T_m \Delta V_{tr} / \Delta H$$

(ΔH – энтальпийный эффект денатурации) на основании имеющихся данных об изменении T_m при повышении давления, приведены в Таблице 10-4.

Таблица 10-4. Влияние давления на температуру денатурации T_m и объёмный эффект денатурации природных и синтетических полинуклеотидов. *Из работы [639].*

DNA	Salt Concentration	$\Delta T_m / \Delta P$ (10 ⁻² К МПа ⁻¹)	ΔV_{tr} (cm ³ mol ⁻¹)	Ref.
Calf thymus	[NaCl] = 30 mM	4.49	-4.5	[16]
	[KCl] = 140 mM	2.34	-2.7	[17]
	[KCl] = 5 mM	0.46	-0.51	[18]
	[KCl] = 20 mM	1.4	-1.58	
	[KCl] = 50 mM	2.0	-2.27	
	[KCl] = 200 mM	2.9	-3.32	
<i>C. perfringens</i>	[KCl] = 500 mM	3.5	-4.02	
	[NaCl] = 10 mM	0.54		[19]
	[NaCl] = 50 mM	2.0		
	[NaCl] = 120 mM	2.6		
	[NaCl] = 360 mM	3.8		
poly[d(A-T)]	[NaCl] = 1.08 M	4.1		
	[NaCl] = 3.6 M	4.6		
	[NaCl] = 20 mM	0.36	-0.36	[23]
	[NaCl] = 50 mM	0.93	-0.90	
poly(dA)·poly(dT)	[NaCl] = 200 mM	2.26	-2.14	
	[NaCl] = 1.0 M	3.86	-3.57	
	[NaCl] = 20 mM	2.49	-2.60	[23]
poly[d(G-C)]	[NaCl] = 50 mM	3.15	-3.44	
	[NaCl] = 200 mM	3.86	-4.59	
	[NaCl] = 52 mM	4.51	-4.80	[24]
	[NaCl] = 107 mM	4.79	-5.16	
poly(rA)·poly(rU)	[NaCl] = 300 mM	5.01	-5.50	
	[NaCl] = 1.0 M	6.41	-6.03	
	[K ⁺] = 50 mM	-1.07	0.96	[25]
poly[d(I-C)]	[NaCl] = 75 mM	0.28	-0.26	[26]
	[NaCl] = 270 mM	1.36	-1.25	
	[NaCl] = 1.0 M	2.64	-2.39	

Как видно из таблицы, повышение давления способствует стабилизации двухцепочечных молекул для различных пар нуклеотидов, типов последовательностей, при различных значениях рН и концентрации солей. Однако имеются и исключения: денатурация poly(rA)·poly(rU) при концентрации [K⁺] равной 50 mM протекает с незначительным уменьшением объёма, т.е. в этом случае давление оказывает дестабилизирующее влияние на уотсон-криковские пары, [644]. Имеются данные (не обсуждаемые в работе [639] и потому отсутствующие в Таблице 10-4), согласно которым

денатурация двухцепочечной ДНК poly[(dA-T)], а также химеры poly(dA)·poly(U), состоящей из комплементарных цепей ДНК и РНК, также протекают с уменьшением объёма, [645,646].

Интересно отметить, что дестабилизирующее влияние давления на уотсон-криковские пары, обнаруженное для некоторых типов нуклеотидов, может быть скомпенсировано, если повысить концентрации некоторых одновалентных катионов. Согласно [461], объёмный эффект денатурации двухцепочечных ДНК значительно увеличивается при повышенных концентрациях NaCl, KCl и CsCl в растворе, Рис 10-19.

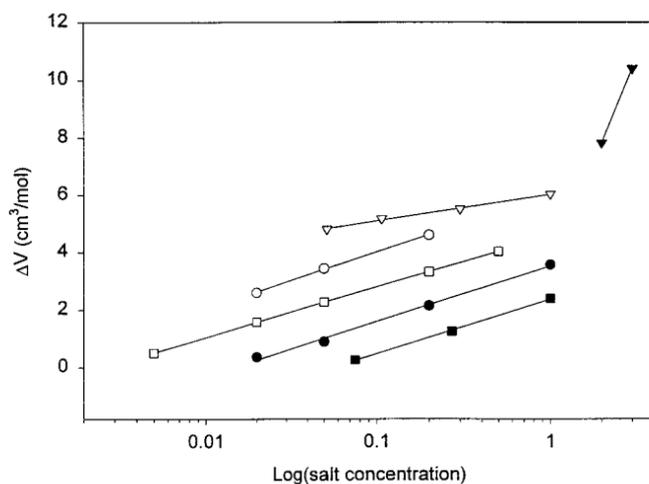


FIGURE 1 Volume change of the helix–coil transition vs the logarithm of the salt concentration for synthetic DNA and calf thymus DNA. Poly[d(A-T)] (●), poly(dA)poly(dT) (○), poly(dA)poly(dT)₂ (▼), poly[d(G-C)] (▽), poly[d(I-C)] (■), and calf thymus DNA (□). The salt was NaCl in all cases except for calf thymus where the salt was KCl. The data for calf thymus DNA is taken from Ref. 12; for poly[d(A-T)] and poly(dA)poly(dT)₂ from Ref. 17; poly[d(G-C)] from Ref.19; and poly[d(I-C)] from Ref. 6.

Рис 10-19. Влияние концентраций одновалентных ионов на объёмный эффект денатурации двухцепочечных ДНК. *Из работы [461].*

Согласно [647,461], влияние одновалентного катиона на объёмный эффект денатурации ΔV_{tr} определяется, в первую очередь, его ионным радиусом, так что эффект увеличения ΔV_{tr} снижается в ряду $Cs^+ > K^+ > Na^+$. Например, денатурация упоминавшейся выше искусственной двухцепочечной ДНК poly[(dA-T)] протекает с уменьшением объёма при очень низких концентрациях солей. Однако уже при 0.02 М одновалентного катиона ΔV_{tr} становится положительным; максимальное значение $\Delta V_{tr} = 6.2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ наблюдается при концентрации CsCl в растворе равной 1.0 М, Рис. 10-19. Сходное поведение описано для объёмного эффекта денатурации двухцепочечного ДНК-полимера poly(dA)·poly(dT), [648], Рис. 10-20.

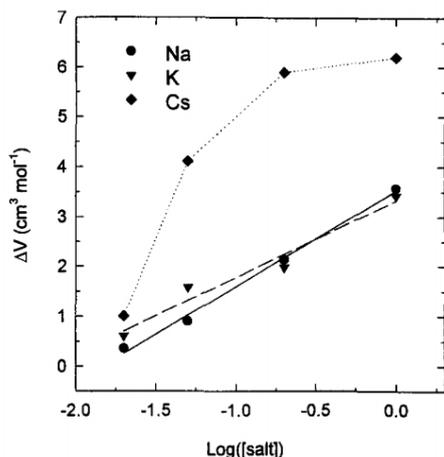


Fig. 4. Molar volume change of the helix-coil transition of poly[d(A-T)] as a function of salt concentration in aqueous NaCl (●), KCl (▼), and CsCl (◆).

Рис 10-20. Влияние концентрации одновалентных ионов на объёмный эффект денатурации двухцепочечной ДНК poly[(dA-T)].

Из работы [647].

Из приведенных данных следует, что при достаточно высокой концентрации одновалентных катионов высокое давление должно способствовать образованию уотсон-криковских пар для любых последовательностей нуклеотидов ДНК. Однако для РНК и ДНК-РНК химер такие данные отсутствуют. Поэтому у нас не может быть уверенности, что этим способом могут быть стабилизированы также и уотсон-криковские пары, возникающие при таких процессах, как транскрипция ДНК и репликация РНК стемпингом. Отметим также, что сочетание высоких концентраций электролитов с высоким давлением (6 kbar) может привести к стабилизации двойных спиралей в Z-конформации, если цепочки полинуклеотида состоят из чередующихся пуриновых и пиримидиновых остатков, [639]. В этой связи важно упомянуть о наличии альтернативной возможности стабилизации уотсон-криковских пар при высоких давлениях (обсуждаемая далее), заключающейся в использовании интеркалятов.

Интересная особенность денатурации, которой можно воспользоваться при полимеризации нуклеотидов, была выявлена при исследовании влияния длины олигомера на стабилизацию уотсон-криковских пар давлением. Пары нуклеотидов, расположенные на концах двухцепочечных олигомеров, менее стабильны, чем пары, более удалённые от конца. Это явление, хорошо изученное при атмосферном давлении, называют *эффектом обтрёпанного конца (fraying end)*, [461]. В работе [649] обнаружено, что вклад концевых пар нуклеотидов в удельный объём олигомеров ДНК также отличается от вклада пары нуклеотидов, удалённой от конца молекулы.

Автор [649] изучил влияние давления на температуру денатурации T_m олигомеров ДНК разной длины, $(dA)_n(dT)_n$, где $n = 11, 15$ и 19 , в 50 mM растворе NaCl. Сравнение результатов с аналогичными данными для полимера $(dA)(dT)$ показало наличие обратно пропорциональной зависимости между dT_m/dP и длиной олигомера. Последнее означает, что объёмный эффект реакции образования уотсон-криковской пары уменьшается с укорочением олигомера. Согласно оценкам данного автора, уотсон-криковская пара, расположенная на каждый из двух концов олигомера, занимает объём на 12 cm³/mol больший объёма пары, удалённой от конца. Отсюда следует, что при высоком давлении уотсон-криковские пары, адсорбированные основой, будут проявлять тенденцию к кооперации. Бесконечная строка из параллельно ориентированных, примыкающий одна к другой уотсон-криковских пар будет иметь меньшую свободную энергию, чем такое же количество одиночных пар, удалённых одна от другой.

10.5.3. Влияние давления на устойчивость неканонических пар нуклеотидов.

В литературе имеются сведения о стабильности двух типов ДНК с неканоническими парами нуклеотидов при высоком гидростатическом давлении: хугстиновских пар в составе трёхцепочечной ДНК и G-квадруплексов. Эти два типа структур обнаруживают

противоположные тенденции; первые с повышением давления становятся более стабильными, а вторые – менее стабильными.

Выше, в разделе 10.4.2, обсуждалось влияние активности H_2O на устойчивость хугстиновских пар нуклеотидов в составе ДНК из двух параллельных цепочек полимера и в трёхцепочечной ДНК, см. Рис. 10-14. Там же указано, что стабилизация хугстиновских пар в составе трёхцепочечной ДНК сообщает дополнительную стабильность уотсон-криковским парам (в составе той же молекулы) и поэтому, вероятно, является явлением благоприятным, способствующим правильному протеканию стемпинга.

О влиянии давления на стабильность хугстиновских пар полинуклеотидов, состоящих из двух параллельных цепочек, пока ничего не известно. Сведения о влиянии давления на устойчивость трёхцепочечной ДНК содержатся в работе [650], посвященной сравнительному исследованию устойчивости двух- и трёхцепочечной ДНК при высоких давлениях. Согласно этим данным, поведение трёхцепочечной ДНК при высоких давлениях аналогично поведению ДНК из двух антипараллельных цепочек, но все описанные эффекты имеют бóльшую амплитуду. Подобно уотсон-криковским парам, звенья трёхцепочечной ДНК стабилизируются давлением, но в бóльшей степени. Так, согласно [650], объёмный эффект (ΔV_T) денатурации ДНК-полимера $\text{poly}(\text{dA})\cdot\text{poly}(\text{dT})$ имеет положительную величину, меняясь от $+2.60$ до $+4.59 \text{ cm}^3/\text{mol}$ в диапазоне концентраций $0.020 - 0.20 \text{ M NaCl}$. Если же к этому полимеру добавить ещё одну цепочку $\text{poly}(\text{dT})$ (за счёт образования хугстиновских пар) с возникновением трёхцепочечной спирали $\text{poly}(\text{dA})\cdot\text{poly}(\text{dT})_2$, то объёмный эффект денатурации увеличивается, изменяясь от $+7.81$ до $+10.4 \text{ cm}^3/\text{mol}$ (в диапазоне от 1.0 до 3.0 M NaCl).

Выше было упомянуто о дополнительной стабилизации уотсон-криковских пар давлением при повышении концентрации одновалентных катионов в растворе. Объёмный эффект реакции денатурации двухцепочечных полинуклеотидов увеличивается с возрастанием концентрации таких ионов, и в результате стабилизирующее действие давления на уотсон-криковские пары усиливается, Рис. 10-19 и 10-20. Согласно авторам [650], аналогичный эффект имеет место и для трёхцепочечной ДНК, и он тоже имеет бóльшую амплитуду. Повышение давления в присутствии одновалентных катионов стабилизирует уотсон-криковские пары в составе трёхцепочечной ДНК в большей степени, чем аналогичные пары в двухцепочечной ДНК.

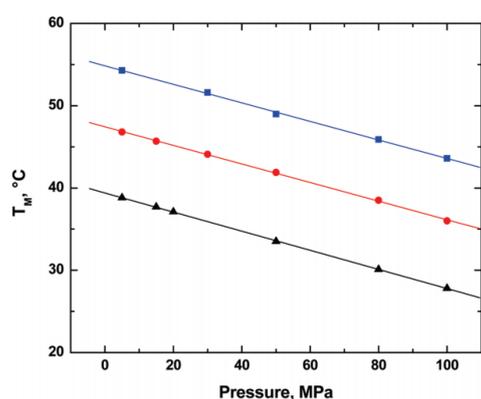


Figure 4. Pressure dependence of the helix-coil transition temperature, T_M , as a function of hydrostatic pressure at 20 mM (\blacktriangle), 50 mM (\bullet), and 100 mM (\blacksquare) NaCl. The lines are linear least-squares fits of the data; 0.1 MPa is atmospheric pressure.

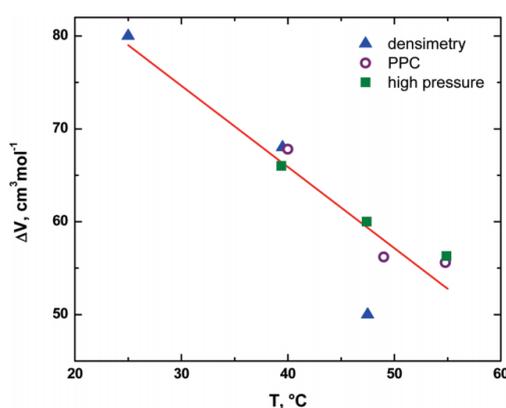


Figure 6. Dependence of the transition volume on the temperature for the three methods employed in this work. The slope of the temperature dependence equals the expansibility change for the reaction. A linear, least-squares fit of the data yields a slope of $-0.87 \pm 0.16 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Рис 10-21. Влияние давления на устойчивость G-квадруплексов, состоящих из двух G-квартетов, как на Рис 10-15. Слева: Зависимость температуры денатурации G-квадруплекса от давления для трёх различных составов раствора. Справа: Объёмный эффект денатурации G-квадруплекса как функция температуры денатурации, определённый различными методами.

Из работы [630].

Поведение G-квадруплексов при высоком гидростатическом давлении исследовано в работах [630] и [639]. Давление оказывает дестабилизирующее воздействие на G-квадруплексы, выражающееся в быстром уменьшении температуры их денатурации с ростом давления, см. левый график на Рис. 10-21. Столь резкая дестабилизация этих структур является следствием высокого объёмного эффекта реакции денатурации. Авторы [630] определили этот объёмный эффект тремя разными способами (непосредственные замеры плотности раствора, расчет по уравнению Клапейрона, а также новая калориметрическая методика определения приращений объёма, называемая *Pressure-Perturbation Calorimetry*). Результаты всех определений оказались в прекрасном соответствии, как видно на правом графике, Рис. 10-21. В зависимости от концентрации и типа одновалентного катиона, объёмный эффект денатурации изменяется в диапазоне 50 – 80 cm³/mol.

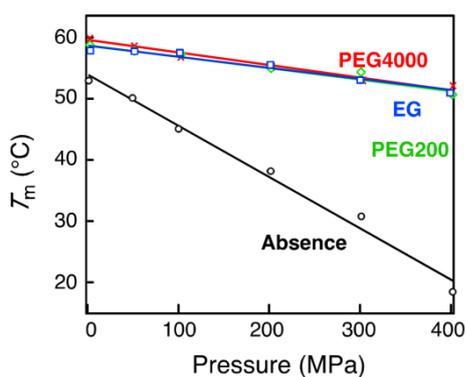


Рис 10-22. Зависимость температуры денатурации G-квадруплекса ДНК от давления в присутствии этиленгликоля (синий), PEG 200 (зелёный) и PEG 4000 (красный). Черная прямая показывает температуру денатурации в отсутствие разбавителя.

Из работы [639].

Дестабилизирующее влияние давления на G-квадруплексы несколько ослабляется при разведении раствора нейтральным неводным растворителем. Согласно [639], температура денатурации G-квадруплексов в растворе с 40 wt% этиленгликоля или полиэтиленгликоля различной молекулярной массы не столь резко убывает при повышении давления, Рис. 10-22. Тем не менее, и в этих условиях тенденция к дестабилизации G-квадруплексов гидростатическим давлением сохраняется.

10.5.4. Влияние давления на устойчивость интеркалятов.

Было опубликовано несколько исследований взаимодействия ДНК и РНК с интеркалирующими агентами, выполненных с разной степенью детальности.

Спектроскопическое исследование комплекса ДНК из молока лосося с акридиновым оранжевым (Рис. 10-23) при комнатной температуре и давлении до 4.5 kbar, выполненное авторами [652], не выявило каких-либо признаков диссоциации интеркалята.

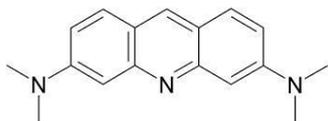


Рис 10-23. Акридиновый оранжевый.

Исследования плотности водных растворов четырёх синтетических двухцепочечных полинуклеотидов ДНК и РНК и одного трёхцепочечного, интеркалированных бромистым этидием (Рис. 10-2), было проведено авторами [653]. Согласно их данным, показанным в Таблице 10-5, интеркалирование этим соединением во всех случаях сопровождается уменьшением объёма, и давление, тем самым, должно стабилизировать интеркалят.

Таблица 10-5. Изменение мольных объёмов и адиабатической сжимаемости полинуклеотидов при интеркаливании их бромистым этидием. Из работы [653].

Table 1. Changes in Volume, ΔV , and Adiabatic Compressibility, ΔK_S , Accompanying Ethidium Binding to the Nucleic Acid Structures

polynucleotide	ΔV ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	ΔK_S $10^{-4} \text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{bar}^{-1}$
poly(rA)poly(rU)	-7.9 ± 0.7	-7.3 ± 1.5
poly(dAdT)poly(dAdT)	-6.8 ± 0.7	-1.0 ± 1.5
poly(dGdC)poly(dGdC)	-7.4 ± 0.7	-3.9 ± 1.5
poly(dIdC)poly(dIdC)	-10.3 ± 0.7	-3.6 ± 1.5
poly(rU)poly(rA)poly(rU)	-2.5 ± 0.7	-7.3 ± 1.5

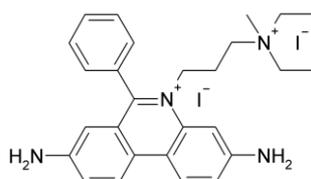


Рис 10-24. Пропидия йодид.

Выше, при обсуждении влияния активности воды на устойчивость интеркалятов, отмечалось, что реакции их образования, как правило, протекают с присоединением большого количества молекул воды. Единственным исключением был бромид этидия, связывающийся с ДНК без присоединения или высвобождения молекул H_2O . Тем самым, уменьшение объёма, сопровождающее присоединение бромида этидия к ДНК и РНК (второй столбец в таблице 10-5), не связано с эффектами гидратации.

В целом, давление как правило оказывает стабилизирующее влияние на интеркаляты, однако исследования, представленные в [648,654,655] показали, что для некоторых полинуклеотидов влияние давления может иметь небольшой дестабилизирующий эффект. Авторы исследовали объёмный эффект реакций интеркалирования двухцепочечных Poly[d(A-T)]·Poly[d(A-T)], Poly(dA)·Poly(dT) и Poly[d(G-C)]·Poly[d(G-C)] такими агентами, как этидия бромид, пропидия йодид (Рис. 10-24) и дауномицин (Рис. 10-16, С). Объёмный эффект определялся термодинамически двумя методами: из данных об изменении температуры денатурации T_m двухцепочечного полинуклеотида вследствие интеркалирования при высоком давлении и из данных о зависимости константы диссоциации интеркалята от температуры и давления. Как выяснилось, интеркалирование двух полинуклеотидов, Poly[d(A-T)]·Poly[d(A-T)] и Poly[d(G-C)]·Poly[d(G-C)], сопровождается уменьшением объёма, в согласии с предшествующими данными, а при интеркаливании Poly(dA)·Poly(dT) всеми тремя агентами имеет место увеличение объёма. Впрочем, увеличение объёма невелико. Для получения интеркалированного Poly(dA)·Poly(dT) при высоком давлении достаточно увеличить концентрацию соответствующего интеркалирующего агента в растворе. Константы диссоциации девяти исследованных интеркалятов для разных значений температуры, концентрации NaCl, CsCl и давления (в диапазоне от 1 bar до 2 kbar), представлены в [648,655]. Возможность получения интеркалятов при гидростатическом давлении до нескольких килобар сомнения не вызывает.

10.5.5. Влияние давления на стабильность фосфодиэфирных связей.

Стабилизация фосфодиэфирной связи в полинуклеотидах при высоком давлении будет иметь место, если сразу две реакции: переэтерификация этой связи с образованием циклофосфата, Рис. 9-1 (а), и её гидролиз, Рис. 9-1(б), протекают с увеличением объёма.

В химической термодинамике объёмные эффекты реакций обычно рассчитывают из величин парциальных мольных объёмов участвующих соединений. К сожалению, обзор имеющихся данных для нуклеиновых кислот приводит к выводу о невозможности таких оценок. Несмотря на то, что исследованию волюметрических свойств полинуклеотидов в водных растворах (гл. обр. парциальные мольные объёмы и адиабатическая сжимаемость) посвящены многие десятки публикаций, свойства моонуклеотидов не были изучены столь детально. Парциальные мольные объёмы UMP (в виде натровой соли) в воде и в растворе мочевины были определены в [656]. Для GMP (натровая соль) парциальный мольный объём измерен в [654]. Однако свойства полимеров, состоящих из этих двух мономеров, исследованы не были.

Ещё одно обстоятельство, препятствующее оценкам объёмных эффектов реакций из данных о парциальных мольных объёмах, заключается в необычайной вариативности волюметрических свойств полинуклеотидов. Выше уже упоминался факт аномального увеличения парциальных мольных объёмов ДНК при небольших изменениях температуры. К этому можно добавить, что изменения в составе раствора сопровождаются не меньшими вариациями объёмов. Например, согласно [659], парциальный мольный объём ДНК из вилочковой железы телёнка увеличивается примерно на 10 cm^3 (на моль нуклеотида) при повышенных концентрациях щелочноземельных катионов: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} . Реакции протонирования и депротонирования нуклеотидов имеют ещё больший объёмный эффект, [464].

Альтернативный способ оценки устойчивости фосфодиэфирной связи мог бы состоять в непосредственном исследовании реакций энзиматического гидролиза или полимеризации ДНК и РНК при высоких давлениях. Однако эта возможность блокируется специфическими особенностями процесса связывания ферментов с субстратом. Повышение давления обычно приводит к диссоциации комплекса (протеинового) фермента с субстратом, которым в данном случае является нуклеиновая кислота. Например, повышение давления до 500 bar увеличивает равновесную константу диссоциации комплекса белка *VamHI* с его специфическим субстратом 5'-G'GATCC-3' примерно в десять раз. Объёмный эффект реакции диссоциации комплекса оценен в (феноменальные) $-92 \text{ cm}^3/\text{mol}$, [660]. Известно лишь одно исключение из этой закономерности – белок топоизомераза I типа, не утрачивающая связи с субстратом при повышении давления. Однако данные о реакции, катализируемой этим ферментом, позволяет лишь сделать общий вывод о стабилизирующем влиянии давления на фосфодиэфирные связи в двухцепочечной ДНК. Уникальную возможность судить о влиянии давления на стабильность фосфодиэфирных связей в одноцепочечной РНК предоставляют исследования кинетике реакций, в которых рибозимы рассекают собственную молекулу.

10.5.5.2. Влияние давления на фосфодиэфирные связи в двухцепочечной ДНК.

Известен лишь один фермент, рассекающий фосфодиэфирную связь в ДНК и не утрачивающий активности при повышенных давлениях – топоизомераза I типа. Это белок, способный релаксировать отрицательную сверхспирализованную ДНК (*supercoiling*) путём внесения одноцепочечного разрыва фосфодиэфирной связи с последующим воссоединением. Разрывы вносятся без использования АТФ, за счёт энергии скручивания макромолекулы. Топоизомераза I не требует для своей активности ионов двухвалентных металлов (таких как Mg^{2+}). Фермент действует обратимо, поддерживая равновесную степень отрицательной сверхспирализации ДНК посредством повторяющихся циклов разрыва фосфодиэфирной связи, поворота молекулы вокруг второй (остающейся не рассечённой) цепочки ДНК и воссоединения концов.

В работе [661] изучена активность топоизомеразы I при давлении до 1.6 kbar. Исследованный фермент сохранял способность релаксировать сверхспирализацию ДНК, хотя время, необходимое для достижения равновесной степени скручивания ДНК,

увеличивалось с ростом давления. Равновесный угол скручивания возрастает как линейная функция давления с наклоном $d\Omega/dP = 0.11$ град/kbar·нуклеотид, где Ω – это угловая мера скручивания (отношение угла скручивания к длине ДНК). Авторы также исследовали влияние давления на равновесную степень скручивания ДНК при наличии Mg^{2+} в растворе. При концентрации $Mg^{2+} 10$ mM равновесная степень скручивания возрастает быстрее, так что $d\Omega/dP = 0.16$ град/kbar·нуклеотид.

Точная природа и механизм взаимодействий, приводящих к скручиванию ДНК в спираль, остаются неизвестными. Предполагается, что это, главным образом, баланс двух противодействующих усилий: электростатического отталкивания фосфатных групп в соседних нуклеотидах, усиливающего скручивание спирали, и стэкинга, способствующего её раскручиванию. Вклад фосфодиэфирных связей, способных изменять длину без затрат энергии, скорее всего незначителен, [461]. Поскольку, как отмечалось выше, структура двойной спирали ДНК и основные взаимодействия в ней остаются практически неизменными по крайней мере при давлении до 12 kbar, увеличение угла скручивания при повышении давления следует интерпретировать как свидетельство стабилизации фосфодиэфирной связи. В самом деле, топоизомераза I осуществляет разрыв фосфодиэфирной связи за счёт энергии деформации скрученной спирали ДНК. Увеличение степени скручивания, необходимой для разрыва связи, говорит о том, что связь стала более прочной. К сожалению, этот общий вывод не позволяют количественно оценить степени стабилизации ДНК давлением. Остаётся неясным, например, является ли фосфодиэфирная связь термодинамически стабильной при $P = 1.6$ kbar или нет. Но сам факт стабилизирующего влияния на давления на фосфодиэфирную связь в двухцепочечной ДНК сомнения не вызывает.

10.5.5.3. Стабильность одноцепочечной РНК при повышенных давлениях.

В отличие от ферментов, утрачивающих способность связываться с субстратом при повышении гидростатического давления, рибозимы остаются активными по крайней мере при давлении в несколько kbar, возможно, потому что субстратом молекулы рибозима служит она сама. Имеются также данные о каталитическом расщеплении тРНК ионам Rb^{2+} при повышенном давлении. Оценки объёмных эффектов реакций переэтерификации фосфодиэфирных связей GrA, DpG, CpG в олигомерах одноцепочечных РНК и гидролиза связи CpA в олигомере двухцепочечной РНК, полученные из этих данных, собраны в виде таблицы в конце данного раздела. Как указывалось выше, оценки эти основаны на экстраполяции кинетических данных и поэтому являются модельно-зависимыми. При внимательном рассмотрении экстраполяция в некоторых случаях оказывается неоправданной. Для нас, поэтому, важно обсудить не только опубликованные значения объёмных эффектов реакций, но и методологию получения этих оценок.

Все оценки объёмных эффектов реакций разрыва фосфодиэфирных связей основаны на исследовании зависимости константы равновесия (K) и константы скорости реакции (k) от давления, выражаемой уравнениями

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial P} \right)_T = -\Delta V/RT, \quad (A)$$

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T = -\Delta V^\ddagger/RT. \quad (B)$$

Здесь ΔV и ΔV^\ddagger – это, соответственно, объёмный эффект реакции и активационный объём, а R – газовая постоянная. Оба уравнения необходимы для определения интересующей нас величины ΔV , но при этом второе уравнение является основным источником возможных ошибок экстраполяции, возникающих как следствие постулируемых упрощающих предположений о механизме реакции, [662]. Ниже представлены все имеющиеся исследования влияния давления на каталитическое расщепление фосфодиэфирной связи в РНК.

Переэтерификация связи GrA в *the hairpin ribozyme*. Примером удачного определения объёмного эффекта переэтерификации фосфодиэфирной связи могут служить работы [663,664,665], посвящённые исследованию механизма саморасщепления (*self-cleavage*), осуществляемого двумя разновидностями рибозима, известного как *the hairpin ribozyme*. Этот рибозим, уже обсуждавшийся ранее в разделе 9.1.1, представлен в большом числе как природных, так и искусственно модифицированных молекул. Для поддержания его активности необходимо присутствие ионов Mg^{2+} . В работе [665] был получен и исследован необычный *hairpin ribozyme*, использующий в качестве кофактора экзогенный аденин (наряду с Mg^{2+}).



Рис 10-25. Схема природной и модифицированной разновидностей рибозима *the hairpin ribozyme*, использовавшихся в работах [663,664,665] в исследовании кинетики реакции саморасщепления при повышенных давлениях. (А) Минимальный фрагмент природного рибозима, сохраняющий каталитическую активность. (В) Модифицированный рибозим, использующий аденин в качестве кофактора. Оба рибозима содержат четыре спиральных участка и две петли. Рассекаемая фосфодиэфирная связь показана стрелкой. Точками обозначены нуклеотиды, которыми модифицированный рибозим отличается от природного.

Повышение давления снижает активность как природного, так и модифицированного рибозимов. В качестве примера, на Рис. 10-26 показано, как доля молекул природного рибозима, испытавших саморасщепление в за 60 минут, меняется при увеличении давления от 0 до 2 kbar для разновидности *hairpin ribozyme*, исследованной в [663] (в опытах изменяли только гидростатическое давление, все остальные условия оставались идентичными). Тенденция к резкому уменьшению числа прореагировавших молекул с ростом давления, отчётливо различимая на графике, может быть следствием двух причин: снижения константы скорости реакции k и(или) константы равновесия K . В принципе,

снижение активности рибозима также могло быть следствием каких-то необратимых структурных перестроек в молекуле рибозима, происходящих под действием давления. Однако последняя возможность была авторами исключена. В специальной серии экспериментов они установили, что при сбрасывании давления активность рибозима мгновенно восстанавливается к своему первоначальному значению.

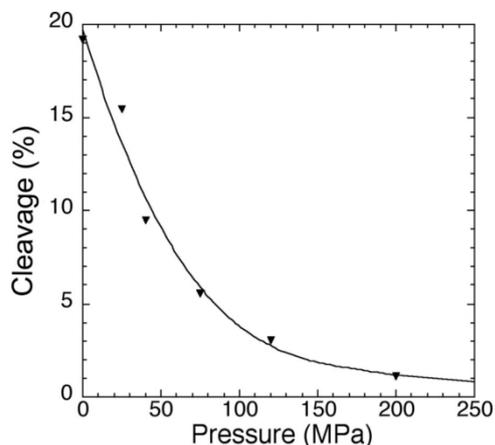


Рис 10-26. Влияние давления на активность *hairpin ribozyme*. Доля молекул, испытавших саморассечение через 1 час после начала реакции, в зависимости от приложенного гидростатического давления. Из работы [663].

Для выяснения причин снижения активности *hairpin ribozyme* авторами [663] была детально исследована кинетика реакции при различных значениях давления, Рис 10-27.

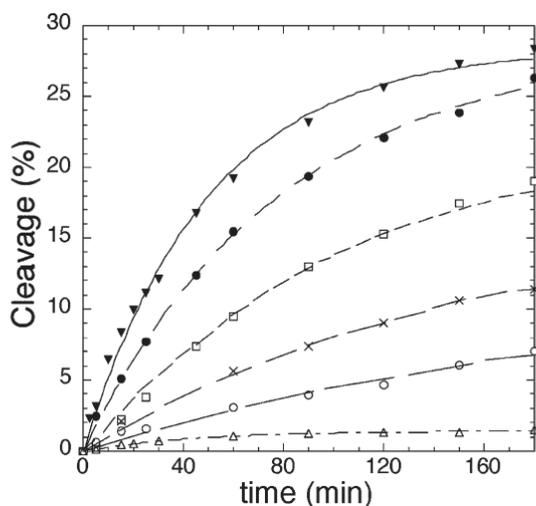


Рис 10-27. Кинетика реакции саморассечения *the hairpin ribozyme* при разных значениях гидростатического давления. Из работы [664].

Fig. 2. Kinetics of the ribozyme reaction as a function of pressure. The ribozyme reaction was followed as indicated in text under various pressures. From top to bottom: 0.1 MPa (atmospheric pressure) (closed triangles), 25 MPa (closed circles), 40 MPa (open squares), 75 MPa (crosses), 120 MPa (open circles) and 200 MPa (open triangles). The experimental conditions were previously described [38]. The kinetics were fitted to the exponential equation: $x = x^{eq}(1 - e^{-k \cdot t})$, where x^{eq} is the fraction of cleaved RNA at equilibrium, x the fraction of cleaved RNA at time t and k the observed cleaving rate constant.

Кинетические кривые на Рис. 10-27 хорошо описываются экспоненциальными зависимостями

$$x = x^{eq}(1 - e^{-kt}), \quad (B)$$

где x^{eq} - равновесное значение концентрации, t - время, а k - константа скорости реакции. Это позволило авторам исследовать зависимости констант K и k от давления. Логарифмы констант K и k , как оказалось, линейно зависят от давления, Рис. 10-28. Из наклона

прямых по уравнениям (А) и (Б) авторами были определены активационный объём и объёмный эффект реакции переэтерификации, соответственно: $\Delta V^\ddagger = 34 \pm 5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ и $\Delta V = 17 \pm 4.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$.

Степень надёжности величины определенного таким образом объёмного эффекта реакции переэтерификации связи GrA определяется точностью, с которой уравнение (В) экстраполирует экспериментальные данные к равновесным условиям, т.е. тем, насколько точно подгоночный параметр x^{eq} в этом уравнении близок к равновесному значению концентрации. Точность определения ΔV могла бы быть улучшена путём увеличения длительности эксперимента. К сожалению, на практике это не делается, потому что исследователи видят свою цель в более точном определении другого параметра – активационного объёма ΔV^\ddagger , способного быть источником информации о механизме катализа.

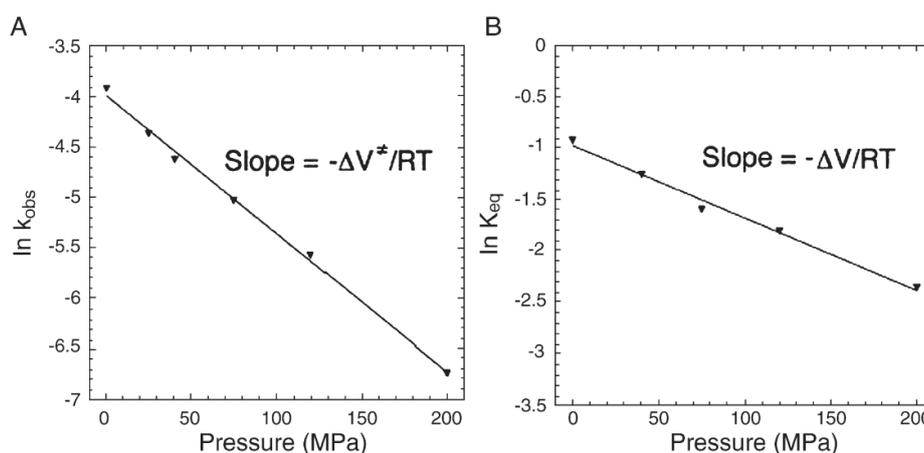


Fig. 3. Determination of the volume changes associated to the ribozyme reaction. (A) The values of the rate constant were extracted from the kinetics presented in Fig. 2. The ΔV^\ddagger of activation was calculated from the slope of the curve $\ln k/\text{pressure}$; (B) in a similar way, the ΔV of the reaction was calculated from the slope of the curve $\ln K/\text{pressure}$.

Рис 10-28. Зависимость константы скорости (А) и константы равновесия (В) реакции саморасщепления *hairpin ribozyme* от давления. Активационный объём ΔV^\ddagger и объёмный эффект реакции ΔV определяются из наклона соответствующих прямых по уравнениям (Б) и (А).

К счастью у нас имеется возможность независимой оценки величины объёмного эффекта реакции переэтерификации той же фосфодиэфирной связи GrA из данных о кинетике саморасщепления другой разновидности *the hairpin ribozyme*, полученной и исследованной в работе [665]. Этот рибозим, показанный на Рис. 163 (В), отличается от рибозима, обсуждённого выше, по составу четырёх нуклеотидов; отличается он и по своим каталитическим свойствам. Тем не менее, части молекул в окрестности рассекаемой связи GrA в обоих рибозимах имеют идентичное строение, и потому объёмные эффекты соответствующих реакций должны быть равны или очень близки по величине.

Как уже было упомянуто, разновидность *the hairpin ribozyme*, исследованная в [665], в качестве кофактора использует аденин. Для поддержания активности этого рибозима требуется наличие и аденина, и ионов Mg^{2+} в растворе, тогда как рибозим, обсуждавшийся выше, активен в присутствии Mg^{2+} , а аденин на его активность влияния не оказывает. Тем самым, каталитические механизмы двух рибозимов отличаются. Исследование кинетики саморасщепления рибозима при повышенных давлениях, выполненное авторами [665], показало, что величина активационного объёма ΔV^\ddagger для него действительно другая, а объёмный эффект ΔV имеет практически то же значение.

В работе [665] было выполнено две серии экспериментов: в одной исследовали рибозим, предварительно выдержанный в растворе, содержащем Mg^{2+} , к которому затем добавляли аденин. В другой серии рибозим предварительно выдерживался в растворе с аденином, а после прибавляли раствор с Mg^{2+} . Результаты экспериментов оказались

различны, но близки: в первой серии $\Delta V^\ddagger = 26 \pm 1.7$ mL/mol и $\Delta V = 16 \pm 1.8$ mL/mol, а во второй $\Delta V^\ddagger = 23 \pm 2$ mL/mol и $\Delta V = 14 \pm 1$ mL/mol. Полученное значение активационного объёма заметно отличаются от найденной в [663,664] для природного рибозима величины $\Delta V^\ddagger = 34 \pm 5$ mL/mol, а значения объёмного эффекта реакции в пределах точности совпадают с полученной в [663,664] оценкой $\Delta V = 17 \pm 4.5$ mL/mol.

Совпадение (в пределах точности) двух независимых оценок объёмного эффекта реакции переэтерификации связи GrA говорит о достоверности найденной величины, позволяющей утверждать, что при давлении в несколько kbar эта фосфодиэфирная связь в полинуклеотидах значительно более стабильна, чем фосфодиэфирная связь в соответствующем циклическом фосфате. Ещё одно экспериментальное свидетельство стабильности этой связи было получено в работе [665] при проверке обратимости катализируемой реакции.

В специальной серии экспериментов авторы [665] установили, что реакция саморасщепления *the hairpin ribozyme* обратима. Они сначала проводили реакцию при атмосферном давлении в течение трёх часов, а затем подняли давление до 1.5 kbar. После повышения давления количество расщеплённых молекул существенно уменьшилось, т.е. приложение давления стимулировало реакцию лигирования. Это доказывает, что фосфодиэфирная связь GrA в полинуклеотидах при достаточно высоких давлениях действительно более стабильна, чем аналогичная связь в циклофосфатах.

Переэтерификация связи DpG в tRNA^{Phe}. Ионы Pb²⁺ при определённых условиях способны катализировать переэтерификацию связи DpG в tRNA^{Phe} (т.е. транспортной РНК аминокислоты фенилаланина). Молекула tRNA^{Phe} в растворе существует в виде глобулы, в которой присутствуют как одноцепочечные, так и двухцепочечные участки. Ион Pb²⁺ специфически катализирует переэтерификацию фосфодиэфирной связи D17–G18 на одноцепочечном участке молекулы. Кроме того иногда наблюдаются дополнительные разрывы фосфодиэфирных связей, следующих за нуклеотидами D16, G19 и G20, однако все они вторичной природы, то есть возникают после разрыва D17–G18, [666]. Способность к каталитическому расщеплению под действием Pb²⁺ является свойством молекулы tRNA^{Phe} как целого. Фрагменты её такой активностью не обладают. Наличие ионов Pb²⁺ тоже составляет одно из необходимых условий активности.

Влияние давления на кинетику расщепления tRNA^{Phe} детально исследовано в работе [667]. Методически работа почти не отличается от обсуждённых выше исследований *the hairpin ribozyme* в [663,664,665], поэтому мы не станем здесь её обсуждать подробно. Отметим лишь, что, в данной работе кинетика реакции изучена в более широком диапазоне давлений – до 8 kbar. Экстраполяция кинетических данных уравнением (B) позволила авторам [667] определить константу равновесия *K* для различных значений давления. Логарифм константы, как и в случае *the hairpin ribozyme*, оказался линейной функцией давления. Объёмный эффект реакции переэтерификации связи DpG, вычисленный из величины углового коэффициента по уравнению (A), равен $\Delta V = 10.2$ cm³/mol. Таким образом, давление и в этом случае стабилизирует фосфодиэфирную связь в одноцепочечном полинуклеotide по отношению к аналогичной связи в циклофосфате.

Гидролиз связи CpG в leadzyme.

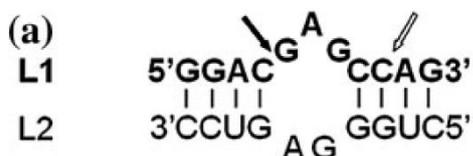


Рис 10-29. Структура молекулы рибозима *leadzyme*, использованного в работе [666]. Жирной стрелкой указана фосфодиэфирная связь, катализируемая *leadzyme* при участии ионов Pb²⁺. Незалитой стрелкой указана связь, рассекаемая спонтанно, в отсутствие Pb²⁺.

Искусственный рибозим, полученный методом селекции *in vitro*, известный под именем *leadzyme* (свинзим), представляет собой небольшой отрезок двухцепочечной спирали РНК с выступом из трёх нуклеотидов посередине, Рис. 10-29. *Leadzyme* – это пока единственный рибозим, катализирующий не только переэтерификацию, но и гидролиз фосфодиэфирной связи. Для поддержания активности необходимо присутствие ионов Pb^{2+} в растворе, т.е. в отсутствие этого типа ионов рибозим неактивен, однако активность может быть модифицирована дополнительными катионами. Например, ионы Mg^{2+} , ингибируют катализ, а ионы редкоземельных металлов усиливают активность рибозима на порядок. Гидролиз протекает в две стадии. Сначала, при участии иона Pb^{2+} , происходит переэтерификация фосфодиэфирной связи с образованием 5'-гидроксила и 2',3'-циклического фосфата, подобно тому, как это имеет место во всех известных рибозимах. На следующей стадии циклофосфат гидролизуется с образованием 3'-фосфата, как в случае рибонуклеазы А, [668] (о рибонуклеазе А см. выше Раздел 9.1.1). Вторая реакция имеет место только для *leadzyme*, в других рибозимах она не наблюдается.

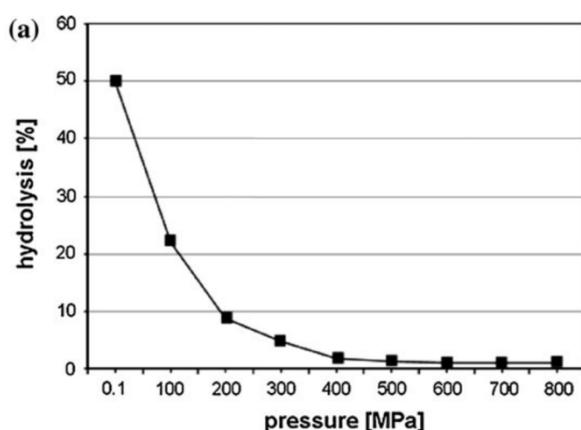


Рис 10-30. Влияние давления на катализируемую *leadzyme* реакцию гидролиза фосфодиэфирной связи CpG. По вертикальной оси отложена степень гидролиза после двухчасовой выдержки.

Влияние давления на активность *leadzyme* исследовано в работе [666]. Разрыв связи CpG происходит в основании трёхнуклеотидного выступа в цепочке, обозначенной на Рис. 10-29 как L1. Особенности взаимодействия нуклеотидов на этом участке, вероятно, близки к таковым в одноцепочечной РНК. При атмосферном давлении максимальная степень гидролиза – 52%, достигается после двухчасовой выдержки. При повышении давления степень гидролиза, достигаемая за то же время, резко уменьшается, так что при давлении $P = 4$ kbar гидролиз практически полностью ингибирован, Рис. 10-30. Авторы исследовали кинетику гидролиза при давлении от 1 bar до 4 kbar по методике, аналогичной описанной выше для *the hairpin ribozyme*. (При более высоких давлениях исследование кинетики оказалось невозможным, поскольку гидролиз был практически блокирован). Найденный авторами [666] объёмный эффект реакции гидролиза связи CpG составил $\Delta V = -24.9 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Тем самым объёмный эффект реакции гидролиза оказался в полтора-два раза выше чем для реакции переэтерификации, т.е. давление препятствует гидролизу в большей степени чем образованию циклофосфата.

Работа [666] – это единственное экспериментальное свидетельство, позволяющее судить о степени стабилизации фосфодиэфирной связи по отношению к гидролизу при повышенных давлениях (все остальные источники характеризуют устойчивость фосфодиэфирной связи к переэтерификации). Важно поэтому подчеркнуть, что опубликованная в ней оценка объёмного эффекта реакции ΔV в меньшей степени зависит от экстраполяции кинетических данных уравнением (В). В самом деле, максимальное время выдержки было достаточным для достижения равновесия при атмосферном давлении. Поэтому надёжность полученной в [666] оценки ΔV сомнений не вызывает.

Помимо разрыва связи CpG, осуществляемого только в присутствии Pb^{2+} , рибозим *leadzyme* обнаруживает ещё один вид каталитической активности, заключающийся в спонтанном разрыве связи CpA на двухцепочечном участке, показанном незалитой стрелкой на Рис. 10-30. Этот тип активности имеет подчинённое значение и пока недостаточно изучен. Известно, что он не зависит от концентрации Pb^{2+} . В работе [666] обнаружено, что указанный тип активности рибозима уменьшается при увеличении давления. Согласно их оценкам, объёмный эффект реакции $\Delta V = 2.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$. К сожалению, для этого типа активности авторы не приводят ни кинетических кривых, ни каких-либо иных подробностей, которые позволили бы судить о надёжности полученных оценок. Из текста статьи нельзя понять даже, имеет ли место гидролиз фосфодиэфирной связи, или же это переэтерификация. Такие данные представляли бы особый интерес, поскольку это единственный изученный пример расщепления фосфодиэфирной связи на двухцепочечном участке РНК. Если приведённая оценка $\Delta V = 2.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ отражает реальное значение объёмного эффекта, это будет означать, что фосфодиэфирная связь в двухцепочечной РНК в меньшей степени стабилизируется давлением, чем в одноцепочечной. Однако опубликованные данные для таких выводов достаточных оснований не дают.

Переэтерификации связи CpG в *the hammerhead ribozyme*. Как уже было неоднократно упомянуто, оценки объёмного эффекта реакций, получаемые из данных о влиянии давления на активность рибозимов, основаны на экстраполяции кинетических кривых к равновесным условиям. Поэтому корректность получаемой оценки ΔV существенным образом зависит от адекватности используемой кинетической модели. В частности, использование уравнения (В) в качестве модели оправдано, если график зависимости степени превращения от времени имеет вид прямой линии в полулогарифмических координатах. Данные для всех обсужденных выше рибозимов этому критерию удовлетворяют. Имеется ещё один рибозим, известный как *hammerhead ribozyme*, активность которого была изучена при высоких давлениях, но интерпретация данных оказалась затруднена вследствие невозможности использования уравнения (В).

Влияние давления (до 4 kbar) на активность одной из разновидностей *the hammerhead ribozyme*, расщепляющей связь CpG на одноцепочечном участке молекулы, была исследована в работе [669]. Кинетические данные при атмосферном давлении не могли быть описаны уравнением (В), но авторы смогли описать свои результаты в предположении о сосуществовании двух популяций молекулы, быстрой, расщепляющей молекулу с высокой скоростью, и медленной, в десятки раз менее эффективной, Рис. 10-31.

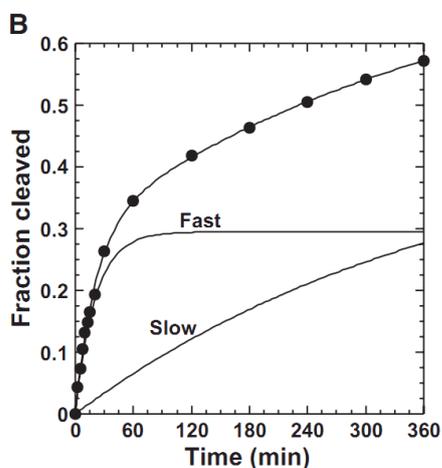


Рис 10-31. Кинетика переэтерификации фосфодиэфирной связи CpG рибозимом *the hammerhead ribozyme* при атмосферном давлении. Зависимость числа расщеплённых молекул от времени может быть описана в предположении сосуществования двух активных популяций молекул – быстрой и медленной, существенно различающихся по своим кинетическим характеристикам.
Из работы [669].

Усложнение кинетической модели, допускающей сосуществование двух популяций молекулы рибозима, приводит к неоправданному увеличению числа подгоночных параметров модели. Авторы обошли эту трудность, постулировав, что реакция переэтерификации происходит без изменения объёма. Они смогли описать свои данные о зависимости активности *the hammerhead ribozyme* от давления, Рис. 10-32, в предположении, что активационные объёмы реакции для быстрой и медленной популяции составляют, соответственно, $\Delta V^\ddagger = 2.6 \text{ cm}^3/\text{mol}$ и $\Delta V^\ddagger = 11.6 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Тем самым, уменьшение доли расщеплённых молекул при повышении давления, отчётливо различимое на Рис 10-32, авторы объясняют сугубо кинетическими причинами, полагая, что константа реакции от давления не зависит.

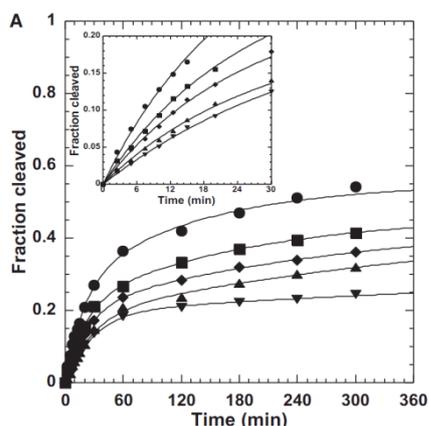


Fig. 3. Effect of hydrostatic pressure on the biphasic profile. (A) Cleavage kinetics are shown for the reactions at atmospheric pressure (●), 100 MPa (■), 200 MPa (◆), 300 MPa (▲), and 400 MPa (▼). Inset: expansion of the first 30-min time points. (B) Linear

Рис 10-32. Влияние давления на кинетику саморасщепления молекул *the hammerhead ribozyme*.

Из работы [669].

Из возможности описания кинетических данных в предположении равенства нулю объёмного эффекта реакции в случае *the hammerhead ribozyme* ещё не следует действительное равенство $\Delta V = 0$. Скорее, это особенность используемой кинетической модели. На Рис. 10-31 хорошо видно, что кинетический эксперимент был остановлен вдали от равновесия – на графике нет признаков выполаживания кинетической кривой, соответствующего замедлению реакции по мере приближения к равновесию. (Такое выполаживание различимо, например, на аналогичном графике для *the hairpin ribozyme*, верхняя кривая на Рис. 10-27. Имеющиеся данные могут быть описаны в предположении $\Delta V = 0$, но у нас не может быть уверенности в успешности такого описания при больших длительностях экспериментов, не 5 часов, а, скажем 10 или 15 часов. При внимательном прочтении выясняется также, что авторы допустили принципиальную ошибку при моделировании. Расчёты выполнены в предположении, что соотношение двух популяций молекул остаётся одним и тем же во всём диапазоне давлений, что возможно только в случае равенства их мольных объёмов. Последнее маловероятно, поскольку изменения в конформации молекулы РНК обычно связаны с перестройками в слое окружающих её молекул воды, сопровождающихся значительными изменениями мольного объёма молекулы. Всё вышесказанное приводит к выводу, что данные работы [664] не могут служить свидетельством равенства нулю объёмного эффекта реакции переэтерификации связи СрG.

Оценка стабилизирующего воздействия давления. Вклад давления в энергетику фосфодиэфирной связи может быть оценен из величины произведения $P\Delta V$, где ΔV – это объёмный эффект реакции, соответственно, переэтерификации или гидролиза. В качестве иллюстрации значения $P\Delta V$ для реакций, обсужденных выше, рассчитанные для $P = 1 \text{ kbar}$ и $P = 5 \text{ kbar}$ приведены в Таблице 10-6.

Таблица 10-6. Оценки стабилизирующего вклада $P\Delta V$ в энергетику фосфодиэфирной связи одноцепочечной РНК, рассчитанные из данных об объёмном эффекте реакций переэтерификации и гидролиза.

Связь	Реакция	Молекула РНК	ΔV (mL/mol)	$P\Delta V$, [kJ] (P = 1 kbar)	$P\Delta V$, [kJ] (P = 5 kbar)	Источник
GrA	переэтерификация	<i>Hairpin ribozyme</i>	17 ± 4.5	1.7	8.5	[663]
GrA	переэтерификация	<i>Hairpin ribozyme</i>	16 ± 1.8	1.6	8.0	[665]
GrA	переэтерификация	<i>Hairpin ribozyme</i>	14 ± 1	1.4	7.0	[665]
DpG	переэтерификация	tRNA ^{Phe}	10.2	1.0	5	[666]
CrG	гидролиз	<i>Leadzyme</i>	24.9	2.5	12.5	[666]

Напомним, согласно выводам, сделанным нами выше, в разделе 10.1.2, при атмосферном давлении фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах термодинамически стабильны по отношению к переэтерификации, а значения ΔG реакции гидролиза этих связей близки к нулю. Коль скоро данные о влиянии давления на активность рибозимов свидетельствуют о стабилизации фосфодиэфирных связей (во всяком случае, для одноцепочечной РНК) относительно обеих реакций, и объёмные эффекты значительны, четвертая стадия стемпинга (соединение нуклеотидов, адсорбированных основой, фосфодиэфирными мостиками) может быть осуществлена при повышенном давлении. Поскольку остаётся неясным, при каких давлениях фосфодиэфирные связи начнут образовываться с достаточно высокой скоростью, принципиальное значение приобретает тот факт, что полинуклеотиды устойчивы в очень широком диапазоне давлений (по крайней мере до 14 kbar, но вероятно и выше, см раздел 10.5.1). Не менее важен и тот факт, что апатит тоже сохраняет устойчивость в необычайно широком диапазоне давлений. Если давлениа в 1 kbar окажется недостаточно для образования фосфодиэфирных связей с желаемой скоростью, давление можно будет повысить до 5, 10, 15 kbar и выше, увеличив стабилизирующую добавку $P\Delta V$ в соответствующее число раз. При достаточно высоком давлении образование фосфодиэфирных связей будет иметь место даже в отсутствие катализа.

10.6. Обсуждение.

Рассмотрение обширного массива данных, прямо или косвенно характеризующих термодинамические свойства полинуклеотидов, выполненный в настоящей главе, позволяет уверенно идентифицировать гидростатическое давление как параметр, варьируя который можно произвольным образом менять степень стабильности фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах по отношению к гидролизу и переэтерификации. Принципиально важен также вывод о близости к нулю свободной энергии реакций гидролиза фосфодиэфирных связей при атмосферном давлении.

Напомним, в главе 4, при описании процесса синтеза двухцепочечного полинуклеотида из мононуклеотидов посредством стемпинга, мы постулировали, что двухцепочечный полинуклеотид, адсорбированный основой, приобретает термодинамическую стабильность лишь когда «включены» все существенные взаимодействия: водородные связи в уотсон-криковских парах, стэкинг, ионные связи между фосфатными группами и кристаллом, и, наконец, фосфодиэфирные связи. «Выключение» любого из перечисленных взаимодействий в этих условиях приведёт к локальной дестабилизации полинуклеотида и его диссоциации. Тот факт, что свободная энергия реакции гидролиза

фосфодиэфирных связей при атмосферном давлении близка к нулю, давление способствует стабилизации этих связей, и при достаточно высоких концентрациях некоторых электролитов рост давления ведёт к дальнейшей стабилизации водородных связей в уотсон-криковских парах и при этом не препятствует стэкингу и, в целом, не препятствует образованию интеркалятов, означает, что постулируемое в описании стемпинга условие действительно может быть выполнено. В некотором диапазоне давлений и составов раствора нуклеотиды войдут в состав синтезируемой двухцепочечной молекулы РНК, а тысячи других молекул, подобных нуклеотидам, будут отторгнуты, поскольку не смогут образовать связей всех четырёх типов. Так, по всей видимости, при возникновении жизни Природа обошла проблему, именуемую *комбинаторным взрывом*.

Далее, тот факт, что с ростом давления имеет место стабилизация фосфодиэфирных связей и вместе с тем возрастает устойчивость (температура денатурации) уотсон-криковских пар (при достаточно высоких концентрациях электролитов, раздел 10.5.2), означает, что повышение давления должно увеличивать скорость образования полинуклеотидов при стемпинге. Поэтому жизнь после возникновения родоначальных молекул РНК должна была переместиться в области более высокого давления, где репликация РНК осуществляется быстрее и проще. Этот вывод служит подтверждением высказанной в разделе 5.5 гипотезы о возникновении трансляции, согласно которой трансляция возникла как адаптация к условиям повышенного гидростатического давления (как приспособление для отделения аминокислот от рибозимов).

Переходя к вопросу о путях воспроизведения стемпинга в лабораторных условиях, имеющиеся данные позволяют предложить две альтернативные стратегии синтеза. Первая, наиболее очевидная, состоит в том, чтобы выполнить начальные стадии стемпинга при атмосферном давлении (адсорбция моно- и полинуклеотидов апатитом), затем повысить давление до значений, обеспечивающих достаточно быстрое образование фосфодиэфирных связей. При таком подходе в качестве исходных могут быть испробованы нуклеозидмонофосфаты и нуклеозидциклофосфаты, поскольку при повышении давления фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах стабилизируются по отношению к обеим реакциям – переэтерификации и гидролиза. Величина давления, необходимая для достаточно быстрого образования фосфодиэфирных связей может быть уменьшена посредством катализа.

Альтернативная возможность для образования фосфодиэфирных связей при стемпинге усматривается в сочетании двух фактов: эти связи в полинуклеотидах стабильны по отношению к переэтерификации. В то же время, вследствие феномена «энтропийного пеньальти», фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах, адсорбированных основой, более стабильны по отношению к гидролизу нежели аналогичные связи в свободных полимерах. Поэтому в принципе может существовать возможность успешного синтеза полинуклеотидов при атмосферном давлении, если в качестве исходных используются нуклеозидциклофосфаты. Возможно, сочетание нескольких факторов: «энтропийного пеньальти», понижение активности воды в системе, повышение температуры и катализ, – позволит стабилизировать фосфодиэфирные связи по отношению к гидролизу, так что соединение нуклеотидов фосфодиэфирными связями (за счёт переэтерификации циклофосфатов) произойдёт достаточно быстро, а гидролиз этих связей будет подавлен.

11. Заключение.

Несмотря на значительный объём настоящей монографии, обилие и разнообразие обсуждаемых фактов, вся она посвящена анализу лишь одной идеи – представлению о стемпинге, как о процессе, посредством которого жизнь возникла, и на котором основывалось наследование на стадии добиологической эволюции. Напомним, в главе 4 нами сформулированы одиннадцать ограничений, которым должен удовлетворять процесс синтеза полинуклеотидов, в одно и то же время позволяющий обойти проблемы, возникшие при предшествующих попытках абиогенного синтеза полинуклеотидов, и способный обеспечить передачу наследственной информации от одного поколения к другому во всё время, ушедшее на создание полимераз. В той же главе стемпинг предложен как гипотетический процесс, этим ограничениям удовлетворяющий. Выполнение большей части ограничений усматривается непосредственно из описания процесса, при этом становится ясным, как родоначальные молекулы РНК могли возникнуть в обход проблемы «комбинаторного взрыва», и почему синтезируемые молекулы двухцепочечных полинуклеотидов должны были состоять преимущественно из нуклеотидов одной хиральности и одного типа аномеров. Тот факт, что и остальные ограничения могут быть удовлетворены, продемонстрирован в последующих главах книги, посвященных выяснению возможных путей воспроизведения стемпинга в лабораторных условиях.

В частности, вывод, сделанный в главе 4, о том что жизнь могла возникнуть посредством стемпинга лишь в условиях, приближающихся к термодинамическому равновесию, и только если фосфодиэфирные связи в полинуклеотидах термодинамически стабильны, причём свободная энергия гидролиза этих связей должна быть близка к нулю, получает подтверждение в главе 10. Согласно приведённым в этой главе сведениям, при атмосферном давлении свободная энергия гидролиза фосфодиэфирных связей в полинуклеотидах действительно близка к нулю. В этой же главе найдены и условия, достаточные для термодинамической стабилизации этих связей по отношению к переэтерификации (циклизации) и гидролизу. Далее, важнейший аспект стемпинга состоит в комбинировании ограничений, налагаемых требованием гомологии водородных связей в уотсон-криковских парах, с ограничениями, вытекающими из принципов геометрического соответствия (равенство определённых длин связей в полинуклеотидах некоторым межатомным расстояниям в кристалле основы). Осуществимость такого комбинирования продемонстрирована в главах 5, 7 и 8. В самом деле, в главе 5 показано, что фигурирующий в описании стемпинга ортофосфат есть не что иное как апатит. Возможность выполнения принципов геометрического соответствия между длинами связей в полинуклеотидах и межатомными расстояниями в апатите основы (путём направленных изменений состава апатита) продемонстрирована в главе 7. Данные, свидетельствующие о взаимодействии адсорбированных апатитом нуклеотидов посредством стэкинга, и признаки сохранения уотсон-криковских пар в полинуклеотидах, адсорбированных апатитом, представлены в главе 8. Тем самым получает подтверждение сформулированная в главе 4 гипотеза, согласно которой комбинирование двух ограничительных принципов обеспечило достаточно высокий уровень соответствия принципу комплементарности (*fidelity*), необходимый для передачи наследственной информации, на той стадии эволюции, когда копирование полинуклеотидов стемпингом составляло механизм наследования.

Ещё одну особенность стемпинга, согласно описанию его в главе 4, составляет необычный механизм хемосорбции аминокислот, при которой фосфатные группы сорбируемых молекул помещаются в позиции тетраэдров PO_4 кристаллической структуры ортофосфата. Возможность практического осуществления этого процесса продемонстрирована в главе 6. В этой же главе выяснены и пути регулирования адсорбции и десорбции. В главе 9 предложены пути ускоренного образования

фосфодиэфирных связей при стемпинге посредством катализа. В итоге стемпинг, предложенный в главе 4 как процесс сугубо умозрительный, в главах 6-10 получает полное описание на основании экспериментальных данных.

Развитие представлений о стемпинге как о механизме копирования полинуклеотидов, посредством которого осуществлялось наследование, и о последующих модификациях этого процесса в ходе биологической эволюции, выполненное в главе 5, позволило объяснить впечатляющий набор фактов, ранее не находивших объяснения, а также выявить ранее неизвестные взаимосвязи между многими явлениями. Взятый отдельно, материал главы 5 сам по себе служит доказательством правоты нашей гипотезы о стемпинге как о механизме возникновения жизни. В то же время, сведения представленные в главах 6-10, показывают, что принципиальные особенности стемпинга могут быть осуществлены на практике. Тем самым выдвигаемая нами гипотеза о стемпинге как о механизме возникновения жизни получает двойное обоснование.

Разгадка механизма возникновения жизни позволяет сделать определённые выводы и о причинах её появления на Земле. Помимо жидкой воды и исходного резервуара органических молекул, для возникновения жизни необходимо присутствие минерала, грани кристаллов которого способны поддерживать стемпинг. Сделанный в главе 6 вывод об уникальности гидратированного слоя, ответственного за специфическую хемосорбцию нуклеотидов апатитом при стемпинге означает, что в отсутствие этого минерала жизнь на Земле не смогла бы возникнуть. Кроме того, метаболизм живых существ в значительной мере был предопределён способностью апатита извлекать из водных растворов и концентрировать на своей поверхности нуклеиновые кислоты, кофакторы, аминокислоты, а также способностью этого минерала катализировать ряд биологически-значимых реакций.

Стого говоря, стемпинг – это процесс гипотетический. Тем не менее, его исчерпывающее описание было нами получено на основании имеющихся экспериментальных данных. Сведений, представленных в главах 6-10, достаточно для детального планирования экспериментов по воспроизведению стемпинга в лаборатории. Возможны два вида таких экспериментов: исследование стемпинга как процесса, которому жизнь обязана своим существованием, и изучение возможностей стемпинга для осуществления реакций копирования полинуклеотидов (репликация РНК и ДНК, транскрипция и обратная транскрипция) с последующим использованием результатов в медицине, фармакологии и в биохимических исследованиях. Отметим, эксперименты, выполняемые с целью воспроизведения процессов, в которых могла возникнуть жизнь, следует производить при постоянном гидростатическом давлении, а исследования, выполняемые с целью практических применений, не будут иметь таких ограничений.

В природе, как хорошо известно, не бывает быстрых циклических процессов, сопровождающихся существенными перепадами гидростатического давления. При этом есть примеры геохимических процессов, в которых быстро, более или менее циклическим образом меняются температура, рН и состав раствора. Поэтому экспериментально моделирование процессов возникновения жизни важно проводить при постоянном давлении. В экспериментах же, проводимых с целью дальнейшего практического применения, необходимость создания повышенных давлений может возникнуть лишь на четвёртой стадии стемпинга – при образовании фосфодиэфирных связей. Остальные стадии могут быть осуществлены при атмосферном давлении, что много проще в техническом отношении.

Экспериментальное моделирование процессов стемпинга, выполняемое с общепознавательной целью, должно ответить на два вопроса. Первый состоит в уточнении условий, в которых возможно спонтанное образование двухцепочечных полинуклеотидов из мононуклеотидов. Второй вопрос, на который должен быть получен ответ, формулируется следующим образом: «Почему, возникнув, жизнь не сошла на нет?». Интересно отметить, что второй из этих вопросов в некоторой степени может быть

прояснён уже сейчас, на основании экспериментальных данных, представленных в главах 6-10. Напомним, в главе 5 нами был сделан вывод, что на ранних этапах эволюции, когда копирование полинуклеотидов осуществлялось лишь путём стемпинга природных (абиогенных) кристаллов апатита, жизнь «теплилась» вблизи выходов геотермальных источников, поставлявших свежие, огранённые кристаллы апатита. При рассмотрении материалов глав 6-10 выявляется ещё одно обстоятельство – вблизи геотерм, особенно глубоководных, функционирующих в условиях повышенного давления, создаются условия, способствующие осуществлению *сразу всех* аспектов стемпинга.

Для геотермальных источников на дне океана характерны повышенное гидростатическое давление, высокие концентрации электролитов и повышенные концентрации таких ионов, как Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} . Согласно выводам главы 7, вхождение указанных катионов (имеющих малые значения ионного радиуса) в апатит позволяет уменьшить параметр c его кристаллической решётки в целях более полного выполнения принципов геометрического соответствия. Те же катионы обнаруживаются в активных центрах биметаллических гидролаз и, ввиду обсуждавшегося в главе 9 сходства активного центра с фрагментом структуры апатита, должны катализировать реакции образования фосфодиэфирных связей. Повышение гидростатического давления в одно и то же время способствует термодинамической стабилизации фосфодиэфирных связей между нуклеотидами и усилению водородных связей в уотсон-криковских парах. Для некоторых нуклеотидных последовательностей стабилизирующее воздействие давления на водородные связи имеет место только в области высоких концентраций электролитов, и в то же самое время повышенные концентрации электролитов желательны для десорбции (положительно заряженных) азотистых оснований нуклеотидов с (отрицательно заряженной) поверхности апатита, необходимой для осуществления стэкинга. Кроме того, высокие концентрации электролитов ($CaCl_2$, $NaCl$) составляют одно из условий прочного связывания нуклеотидов с основой. Тем самым, выходы геотерм не только служили источником кристаллов апатита. Вокруг них создавалась среда, наиболее благоприятная для стемпинга. К этому следует добавить, что копирование полинуклеотидов на заре жизни, вероятно, осуществлялось при участии интеркалятов. Использование интеркалирующих агентов одновременно усиливает стэкинг, придавая хемосорбции мононуклеотидов характер кооперативного явления, и вместе с тем усиливает взаимодействия в уотсон-криковских парах. Кроме того, интеркаляты могли быть использованы для катализа реакции образования фосфодиэфирной связи.

При исследовании возможностей практических применений стемпинга, то есть возможностей использовать его как метод копирования полинуклеотидов, на мой взгляд, наиболее важной станет задача отыскания эффективных путей укладки одноцепочечных полинуклеотидов в апатитовую основу. Это единственный процесс, нужный для осуществления стемпинга (точнее, для копирования полинуклеотидов стемпингом), осуществимость которого пока не может считаться доказанной. Тем не менее, есть все основания надеяться, что предлагаемые в разделе 6.4.2 пути решения этой проблемы окажутся эффективными.

Экспериментальное исследование процессов абиогенного синтеза полинуклеотидов, с использованием методов, предлагаемых в настоящей работе, потребует привлечения специалистов из разных областей, таких как рост кристаллов, рентгеновская кристаллография, химия нуклеиновых кислот, атомно-силовая микроскопия. Успех в значительной мере будет определяться скоординированностью их работы.

Процесс стемпинга апатитовой основы, сам по себе, обескураживающее прост. Чувство недоумения вызывает тот факт, что он не был предложен прежде, что обоснование и детализация этой простой идеи потребовали написания объёмистой монографии, и что работа над монографией потребовала от автора экстраординарных усилий.

Список цитируемой литературы.

1. Woese C. 1967. *The genetic code, the molecular basis for genetic expression*. New York: Harper and Row.
2. Crick F.H.C. 1968. The origin of the genetic code. *J Mol Biol* **38**:367-379.
3. Orgel L.E. 1968. Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol* **38**:381-393.
4. Gilbert W. 1986. The RNA world. *Nature* **319** (6055): 618.
5. Check R.C. 2011. The RNA worlds in context.
6. Noller H.F., Chaires J.B. 1972. Functional modification of 16S ribosomal RNA by kethoxal. *Natl Acad Sci* **69**: 3115- 3118.
7. Noller H.F. 1993. Peptidyl transferase: Protein, ribonuclear protein or RNA? *J Bacteriol* **175**: 5297-5300.
8. Freeland S.J., Knigh R.D. Landweber L.F. 1999. Do proteins predate DNA?
9. Orgel L.E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **39**: 99-123.
10. White H.B. 1976. Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *Journal of Molecular Evolution*, **7**(2), 101-104.
11. Benner S.A. Ellington A.D., Tauer A. 1989. Modern metabolism as a palimpsest of the RNA world. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7054-7058.
12. Benner S.A. Ellington A.D. RNA World. *Science*, **253**: 1232.
13. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sands J., Gottschling D.E., and Cech T.R. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**: 147-157.
14. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., and Altman S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857.
15. Joyce G.F. 2002. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature Publishing Group*. Nature|VOL 418|1 JULY 2002|www.nature.com/nature
16. Andrea L. Edwards B.S. and Batey R.T. 2021 Riboswitches: A common RNA regulatory element. *Nature Education* 3(9).
17. Vitreshak A.G., Rodionov D.A., Mironov A.A., Gelfand M.S. 2004. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet* Jan; **20**(1) 44-50.
18. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å resolution. *Science* **261**: 1411-1418.
19. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jt, Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vornrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V., 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **368**: 561-563.
20. Yusupov M., Yusupova G., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H., Noller N.F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution. *Science* **292**: 883-896.
21. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920-930.
22. Steitz T.A., Moore P.B. 2003. RNA, the first macromolecular catalyst: The ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* **28**: 411-418.
23. Ellington A.D. and Szostak J.W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.
24. Robertson D.L. and Joyce G.F. 1990. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**: 467-468.
25. Tuerk C. and Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. **249**: 505-510.
26. Johnson W.K., Unrau P.J., Lawrence M.S., Glasner M.E. and Bartel D.P. 2001. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**: 1319-1325.
27. Tremblay R., Mulhbach J., Blouin S., Penedo J. C. and Lafontaine D. A. 2009. Natural Functional Nucleic Acids: Ribozymes and Riboswitches. Chapter 2, pp 11-46 in *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*. Yingfu Li and Yi Lu (Eds), Springer.
28. Mandal M., Boese B., Barrick J.E., Winkler W.C., and Breaker R.R. 2003. Riboswitchers control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**: 577-586.
29. Breaker R.R., Joyce J.F. 1994. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* 1994, 1: 223-229.
30. Silverman S.K. 2010. DNA as a versatile chemical component for catalysis, encoding, and stereocontrol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**: 7180-7201.

31. Silverman S.K. 2009. Artificial functional nucleic acids: Aptamers, ribosymes, and deoxyribosymes identified by in vitro selection. Ch, 3, pp 47-108 in *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*. Yingfu Li and Yi Lu (Eds), Springer.
32. Keefe A.D. and Miller S.L. 1995. Are polyphosphates or phosphate esters prebiotic reagents? *Journal of Molecular Evolution*. **4** (6): 693-702
33. Lambert J.B., Gurusamy-Thangavelu S.A., and Ma K. 2010. The silicate-mediated formose reaction: Bottom-up synthesis of sugar silicates. *Science*, **327**: 984-986.
34. Mueller D., Pitch S., Kittaka A., Wagner E., Winter C.E. and Eschenmoser A. 1990. Chemistry of alpha aminonitriles. Aldomerisation of glycolaldehyde phosphate to racemes hexose 2,4,6-triphosphates and (in presence of formaldehyde) racemic pentose 2,4-diphosphate: rac-Allose 2,4,6-triphosphate and racemic ribose 2,4-diphosphate are the main reaction products. *Helvetica Chimica Acta* **73**: 1410-1468.
35. Miyakawa S., Cleaves H.J., and Miller S.L. 2002. The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide. *Orig Life Evol Biosph* **32**: 195-208.
36. Miyakawa S., Cleaves H.J., and Miller S.L. 2002. The cold origin of life: B. Implications based on pyrimidines and purines produced from frozen ammonium cyanide solutions. *Orig Life Evol Biosph* **32**: 209-218.
37. Sanchez R.A., Ferris J.P., and Orgel L.E. 1967. Studies in prebiotic synthesis. II. Synthesis of purine precursors and amino acids from aqueous hydrogen cyanide. *J Mol Biol* **30**: 223-253.
38. Sanchez R., Ferris J.P., and Orgel L.E. 1967. Conditions for purine synthesis: did prebiotic synthesis occur at low temperatures? *Science* **153**: 72-73.
39. Costanzo G., Saladino R., Crestini C., Cicirello F., and Di Mauro E. 2007. Formamide as the main building block in the origin of nucleic acids. *BMC Evolutionary Biology* 2007, **7**(Suppl 2):S1
40. Joyce G.F. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature* **338**: 217-224.
41. Fuller W.D., Sanchez R.A., and Orgel L.E. 1972. Studies in prebiotic synthesis. VI. Synthesis of purine nucleosides. *J Mol Biol* **67**: 25-33.
42. Szostak J.W. 2009. Systems chemistry on early Earth. *Nature* **459**: 171-172.
43. Schwartz A.W. 2006. Phosphorus in prebiotic chemistry. *Phil Trans R Soc B* **361**: 1743-1749.
44. Lohrmann, L. and Orgel, L. E. 1971. Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents. *Science* **171**: 490-494.
45. Schwartz A.W., van der Veen M., Bisseling T. and Chittenden G.J.F. 1973. Prebiotic phosphorylation. II-nucleoside synthesis in the reaction system apatite-cyanogen-water. *Biosystems*, **5**(3): 119-122.
46. Reimann R. and Zubay G. 1999. Nucleoside phosphorylation: a feasible step in the prebiotic pathway to RNA. *Orig Life Evol Biosph*, **29**(3): 229-247.
47. Costanzo G., Saladino R., Crestini C., Cicirello F., and Di Mauro E. 2007. Nucleoside phosphorylation by phosphate minerals. *The Journal of Biological Chemistry* **282**(23): 16729-16735.
48. Powner W.M., Gerland B., and Sutherland J.D. 2009. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotide in prebiotically plausible conditions. *Nature* **459**: 239-242.
49. Sutherland J.D. Ribonucleotides. 2010. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
50. Choudhary A., Kamer K.J., Powner M.W., Sutherland J.D., and Raines R.T. 2010. A stereoelectric effect in prebiotic nucleotide synthesis. *ASC Chemical Biology* **5**(7): 655-657.
51. van Holde K. 1980. *The Origins of Life and Evolution*. (Halvorson H.O and van Holde K.E., eds) p.31, Alan R. Liss, Inc., New York
52. Alberty R.A. 2006. Thermodynamic properties of enzyme-catalyzed reactions involving guanine, xanthine, and their nucleosides and nucleotides. *Biophysical Chemistry* **121**, 157-162.
53. Alberty R.A. 2007. Thermodynamic properties of enzyme-catalyzed reactions involving cytosine, uracil, thymine, and their nucleosides and nucleotides. *Biophysical Chemistry* **127**, 91-96.
54. Moravsek J. 1967. Formation of oligonucleotides during heating of a mixture uridine 2'(3')-phosphate and uridine. *Tetrahedron Lett* **18**: 1707-1710.
55. Sawai, H., and Orgel, L.E. 1975. Oligonucleotide synthesis catalyzed by Zn²⁺ ion. *J Am Chem Soc.* **97**: 3532-3533.
56. Sawai, H. 1976. Catalysis of internucleotide bond formation by divalent metal ions. *J Am Chem Soc.* **98**: 7037-7039.
57. Sleeper H.L., and Orgel L.E. 1979. The catalysis of nucleotide polymerization by compounds of divalent lead. *J Mol Evol* **12**: 357-364.

58. Sawai, H., Kuroda, K., and Hojo, T. 1989. Uranyl ion as a highly effective catalyst for internucleotide bond formation. *Bull Chem Soc Jpn* **62**: 2018-2023.
59. Sawai, H., Higa, K., and Kuroda, K. 1992. Synthesis of cyclic and acyclic oligocytidylates by uranyl catalysis in aqueous solution. *Chem Soc Perkin Trans* **1**:505-508.
60. Ferris J.P. 2006. Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: the possible role of catalysis in the origins of life. *Phil Trans R Soc B* **361**: 1777–1786.
61. Gözen E., and Ferris J.P. 200. Sequence- and region-selectivity in the montmorillonite-catalyzed synthesis of RNA. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **30**: 411–422.
62. Huang W., and Ferris J.P. 2006. One-step, regioselective synthesis of up to 50-mers of RNA oligomers by montmorillonite catalysis. *J Am Chem Soc* **128**: 8914-8919
63. Joshi P.C., Pitsch S., and Ferris J.P. 2000. Homochiral selection in the montmorillonite-catalyzed and uncatalyzed prebiotic synthesis of RNA. *Chem Commun*, 2000, 2497–2498.
64. Reyser J.R. and Ferris J.P. 2001. The rates of hydrolysis of thymidyl-3',5'-thymidine-H-phosphonate: the possible role of nucleic acids linked by diesters of phosphorous acid in the origins of life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **31**: 363–380.
65. Zagorevskii D.V., Aldersley M.F., and Ferris J.P. 2006. MALDI analysis of oligonucleotides directly from montmorillonite. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**: 1265–1270.
66. Costanzo G., Pino S., Cicirello F., and Di Mauro E. 2009. Generations of long RNA chains in water. *The Journal of Biological Chemistry* **284**(48) :33206-33216.
67. Shabarova, Z.A. 1988. Chemical development in the design of oligonucleotide probes for binding to DNA and RNA. *Biochimie* **70**:1323-1334.
68. Joyce G.F. 1987. Nonenzymatic template-directed synthesis of informational macromolecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 41-51.
69. Orgel L.E. 1992. Molecular replication. *Nature* **358**: 203-209.
70. Kozlov I.A., and Orgel L.E. 2000. Nonenzymatic template-directed synthesis of RNA from monomers (translated from *Molekulyarnaya Biologiya*). *Molecular biology* **34**: 781-789.
71. Meierhenrich, U.J.; Nahon, L.; Alcaraz, C.; Bredehöft, J.H.; Hoffmann, S.V.; Barbier, B.; Brack, A. 2995. Asymmetric vacuum UV photolysis of the amino acid leucine in the solid state. *Angewandte Chemie International Edition*. **44**: 5630-5634.
72. Joyce G. F., Visser G. M., van Boeckel C. A. A., van Boom J. H., Orgel L. E., and van Westrenen J. 1984. Chiral selection in poly(C)-directed synthesis of oligo(G). *Nature* 310: 602 – 604.
73. Joyce G.F., Schwartz A.W., Millers S.L., AND Orgel L.E. 1987. The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4398-4402.
74. Kozlov I.A., Pitch S. and Orgel L.E. 1998. Oligomerization of activated D- and L-guanosine mononucleotides on templates containing D- and L-deoxycytidylate residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry*. **95**:13448-13452.
75. Fujimori Sh., Shudo K., Hashimoto Y. 1990. Enantio-DNA recognizes complementary RNA but not complementary DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 7436.
76. Asley J.W. 1992. Modeling, synthesis, and hybridization properties of (L)- ribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **114**(25):9731-9736.
77. Garbesi A., Capobianco M.L., Colonna F.P., Maflini M., Niccoiai D., and Tondelli L. 1998. Chirality-modified nucleotides and control of gene expression. *Nucleotides, Nucleosides, and Nucleic Acids*. **17**(7):1275-1287.
78. Urata H., Shimizu H., Hiroaki H., and Akagi M. 2001. Characterization of DNA, RNA and DNA/RNA duplexes containing an L-nucleotide. *Nucleic Acids Research Supplement*. **1**:243-244glkmhl
79. Blommers M.J.J., Tondelli L., and Garbesi A. 1994. Effects of introduction of L-nucleotides into DNA. Solution structure of the heterochiral duplex d(G-C-G-(L)T-G-C-G)d(C-G-C-A-C-G-C) studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry*. **33**:7886-7896.
80. Urata H., Ueda Y., and Akagi M. 2003. Effects of breaking homochirality on DNA structure and stability: Introduction of an L-nucleotide into DNA induces some decrease of helical stability but not critical helical distortion. *Viva Origino* **4**(31).
81. Kawakami J., Tsujita K. and Sugimoto N. 2005. Thermodynamic analysis of duplex formation of the heterochiral DNA with L-deoxadenosine. *Analytical Sciences*. **21**:77-82.
82. Damha M.J., Giannaris P.A., and Marfey P. 1994. Antisense L/D-oligonucleotide chimeras: Nuclease stability, base pairing properties, and activity at directing ribonuclease H. *Biochemistry*, **33**:7877-7885.

83. Marky L.A., Booth E.D., and Brown T. 1990. Structural and thermodynamic studies on the adenine-guanine mismatch in B-DNA. *Nucl. Acid. Res.* **18**:5617-5623.
84. Vichier-Guerre s., Santamarina F., and Ranyer B. 2000. Enantiomeric deoxy-L-nucleotides stabilize a Z-forming DNA decanucleotide. *Tetrahedron Letters* **41**:2101-2104.
85. Cherrak I., Mauffet O., Santamarina F., Hocquet A., Ghomi M., Ranyer B., and Femandjian S. 2003. L-nucleotides and 8-methylguanine of d(C₁^{m8}G₂C₃G₄C_{5L}G_{6L}C₇G₈C₉G₁₀)₂ act cooperatively to promote a left-handed helix under physiological salt conditions. *Nucleic acids Research*. **31**(23):6986-6995.
86. Robertson M.P., and Joyce G.F. 2010. The Origins of the RNA World. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a003608 published online April 28, 2010.
87. Koudelcka G. Assembly and Characteristics of Nuclear Acid Double Helices.
88. Morgan H., Wilson R.M., Elliott J.C. 2000. Preparation and characterisation of monoclinic hydroxiapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate. *Biomaterials*, **21**: 617-627.
89. Povarennykh, A.S. 1972. *Crystal Chemical Classification of Minerals*. New York: Plenum Press.
90. Elliot J.C., Wilson R.M., and Dowker S.E.P. 2002. Apatite structures. *Advances in X-ray Analysis*, **45**:172-181.
91. White T.J. and Zhili D. 2003. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. *Acta Cryst.* **B59**:1-16.
92. Mercier, P.H.J.; Whitfield, P.S.; Mitchell, L.D. Davidson, I.J.; Le Page, Y.; White, T.J. 2005. Geometrical aspects of the crystal chemistry of apatite: an analysis of calcium-lead fluoro-vanadinites. *Advanced Materials (ICMAT 2005)*, Singapore, July 3-8, 2005, **2**:396-401.
93. Данильченко С.Н. 2007. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения (обзор). *Вісник СумДУ. Серія Фізика, маіематика, механіка, №2*, 33-59.
94. Hughes J.M. and Rakovan J. 2002. The crystal structure of apatite, Ca₅(PO₄)₃(F,OH,Cl). In Kohn M.J., Rakovan J., Huges J.M. (eds) *Phosphates: Geochemical, Geobiological and Materials Importance*. Series Reviews in Mineralogy and Geochemistry, Volume 48, Mineralogical Society of America, Washington, DC, 2002, pp. 427-454.
95. Fujii S., and Tomita K. 1976. Conformational analysis of polynucleotides. I. The favorable left-handed helical model for the poly(8,2'-S-cycloadenylic acid) with high anti conformation. *Nucleic Acids Research*, **3**(8):1973-1984.
96. Arnott S. And Hukins D.W. 1972. The dimensions and shapes of the furanose rings in nucleic acids. *Biochem. J.* **130**:453-465.
97. Nowakowski J., Shim P.J., Stout C.D and Joyce G.F. 2000. Alternative conformations of nucleic acid four-way junction. *J. Mol. Biol.* **300**:93-102.
98. Путивцева Н.В. 1985. Типоморфные особенности акцессорного и рудного апатита по данным кристалломорфологического и стереометрического анализа. Диссертация. Москва. 175 страниц.
99. Hedenquist; J.W.; Browne, P.R.L. 1989. The evolution of the Waiotapu geothermal system, New Zealand, based on the chemical and isotopic composition of its fluids, minerals and rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **53**: 2235- 2257.
100. Reyes, A.G. 1985. *A comparative study of "acid" and "neutral pH" hydrothermal alteration in the Bacon-Manito geothermal area, Philippines*. MSc Thesis, University of Auckland. 258p.
101. Christenson, B.W. 1987. *Fluid-mineral equilibria in the Kawerau hydrothermal system, TVZ, New Zealand*. PhD Thesis. Auckland University. 452p.
102. Reyes, A.G. 1990. Petrology of Philippine geothermal systems and the application of alteration mineralogy to their assessment. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. **43**: 279-309.
103. Reyes, A.G. and Giggenbach, W.F. 1992. Petrology and fluid chemistry of magmatic-hydrothermal systems in the Philippines. *Water-Rock Interaction*. Kharaka & Maest (eds). Balkema, Rotterdam.
104. Marchig V., Erzinger J., and Heinze P.-M. 1986. Sediment in the black smoker area of the East Pacific Rise (18.5°S). *Earth and Planetary science Letters*. **79**(1-2):93-106.
105. IAVCEI General Assembly. 2004. Pulcon-Cnile. 11p. /Available online/
106. Stetter K. O. 2006. Hyperthermophiles in the history of life . *Phil. Trans. R. Soc.*, **B 361**:1837-1843.

107. Darwin Ch., M.A. 1859. Ch. XIII in *On the Origin of Species. Or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London: John Murray street.
108. Berg I.A., Kockelkorn D., Ramos-Vera W.H., Say R.F., Zarzycki J., Hügler M, Alber B.E. and Fuchs G. 2010. Autotrophic carbon fixation in Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **8**:447-460.
109. Kibby Ch. L., Lande Sh. S. and Hall W. K. 1972. Tracer studies of acid-catalyzed reactions. XI. Stereoselectivity in alcohol dehydration over hydroxyapatite and alumina catalysts. *J. Am. Chem. Soc.*, **94** (1):214–220.
110. Kibby Ch.L. and Hall W.K. 1973. Dehydrogenation of alcohols and hydrogen transfer from alcohols to ketones over hydroxyapatite catalysts. *Journal of Catalysis*, **31**(1): 65-73.
111. Monma H. 1982. Catalytic behavior of calcium phosphates for decompositions of 2-propanol and ethanol. *Journal of Catalysis*, **75**(1):200–203.
112. Tsuchida T., Sakuma Sh., Takeguchi T. and Ueda W. 2006. Direct synthesis of *n*-butanol from ethanol over nonstoichiometric hydroxyapatite. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **45**(25):8634-8642.
113. Tsuchida T., Yoshioka T., Sakuma Sh., Takeguchi T. and Ueda W. 2008. Synthesis of biogasoline from ethanol over hydroxyapatite catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **47**(5):1443-1452.
114. Tsuchida T., Kuboa J., Yoshioka T., Sakuma Sh., Takeguchi T., Ueda W. 2008. Reaction of ethanol over hydroxyapatite affected by Ca/P ratio of catalyst. *Journal of Catalysis*, **259**:183-189.
115. Krane S.I. and Glimcher M.J. 1962. Transphosphorylation from nucleoside di- and triphosphates by apatite crystals. *The Journal of Biological Chemistry* **237**(9):2991-2998.
116. Neuman M.W., Neuman W.F. and Lane K. 1970. On the possible roles of crystals in the origin of life. III. The phosphorylation of adenosine to AMP by apatite. *Curr. Mod. Biol.*, **3**:277.
117. Neuman M.W., Neuman W.F. and Lane K. 1970. On the possible roles of crystals in the origin of life. IV. The phosphorylation of nucleotides. *Curr. Mod. Biol.*, **3**:277-283.
118. Schwartz A.W., van Der Veen M., Bisseling T. and Chittenden G.J.F. 1975. Prebiotic nucleotide synthesis – demonstration of a geologically plausible pathway. *Origins of Life*, **6**:163-168.
119. Wu J., Zhang Zh. Sh., Yu X.W., Pan H.H., Jiang W.G., Xu X.R. and Tang R.K. 2011. Mechanism of promoted dipeptide formation on hydroxyapatite crystal surfaces. *Chinese Science Bulletin. Inorganic Chemistry*, **56**(7):633-639.
120. Kostetsky E.Y. 2005. The possibility of the formation of protocells and their structural components on the basis of the apatite matrix and cocrystallizing minerals. *J Biol Phys*, **31**:607–638
121. Revilla-López G., Casanovas J., Bertran O., Turon P., Puiggali J. and Alemán C. 2013. Modeling biominerals formed by apatites and DNA. *Biointerphases*, **8**(10), 29 pages.
122. Simionescu C.I., Dumitriu S., Bulacovski V., and Popa V.I, 1978. Synthesis of saccharides by cold plasma decomposition in methane-water-apatite system. *Cellulose Chem. Technol.*, **12**:143-152.
123. Reichle W.T. 1970. The nature of the hydrolysis of chlorobenzene over calcium phosphate apatite. *Journal of Catalysis*, **17**(3):297-305.
124. Stabbe J.J. 1990. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* **265**(10):5329-5332.
125. Kolberg M., Strand K.R., Graff P. and Anderson K.K. 2004. Structure, function and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1699**(1-2):1-34.
126. Hofer A., Crona M., Logan D. T., and Sjöberg B.-M. 2012. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **47**(1):50-63.
127. Stabbe J., Ge J. and Yee C.S. 2001. The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Trends Biochem. Sci.* **26**(2):93-99.
128. Xiong X. 2000. *cDNA Cloning and Gene Characterization of Large and Small Subunits of Ribonucleotid Reductase in Soybean*. Dissertation submitted to the faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in parallel fulfillments of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy in Biology. Blackburg, Virginia.
129. Vaniello A., and Macri F. 1999. Proton pumping pyrophosphatase from higher plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **105**(4):763-768.
130. Serrano A., Perez-Castiñeira J.R., Baltscheffsky M. and Baltscheffsky H. 2007. H⁺-PP₂ases: Yesterday, today and tomorrow. *IUBMB Life*, **59**(2):76-83.
131. Pérez-Castiñeira J.P., Gómez-García R., López-Marqués R.L., Losada M., and Serrano A. 2001. Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants of metabolic cornerstones? *Int. Microbiol.*, **4**:135-142.

132. Baltscheffsky M., and Baltscheffsky H. 1995. Alternative photophosphorylation, inorganic pyrophosphate synthase and inorganic pyrophosphate. *Photosynthesis Research*, **46**(1-2):87-91.
133. Motta L.S., Ramos I.B., Gomez F.M., de Souza W., Champagne D.E., Santiago M.F., Docampo R., Miranda K., and Machado E.A. 2009. Proton-pyrophosphatase and polyphosphate in acidocalcisome-like vesicles from oocytes and eggs of *Periplaneta americana*. *Insect. Mol. Biol.*, **39**:198-206.
134. Hedlund J., Cantoni R., Baltscheffsky M., Baltscheffsky H. and Persson B. 2006. Analysis of ancient sequence motifs in the H⁺-PP_iase family. *FEBS J.*, **273**(22):5183-5193.
135. Trifonov E.N. 2000. Consensus temporal order of amino acids and evolution of the triple code. *Gene*, **261**:139-151.
136. Pudriz R.E. and Higgs P.G. 2010. Thermodynamic basis for prebiotic amino acid synthesis and constraints on the first genetic code. *Astrobiology Science Conference 2010*, p. 5171.
137. Schopf W. J., Kudryavtsev B. A., Czaja A. D., Tripathi A. B. 2007. Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Research* **158**:141-155.
138. Schopf W.J. 2006. The first billion years: When did life emerge? *Elements*, Vol 2 (2006):229-233.
139. Mojzsis S.J., Arrhenius G., McKeegan K.D., Harrison T.M., Nutman A.P., and Friend C.R.L. 1996. Evidence for life before 3,800 million years ago. *Nature* **384**: 55-59.
140. Lepland A. , Arrhenius G., and Cornell D. 2002. Apatite in early Archean Isua supracrustal rocks, southern West Greenland: its origin, association with graphite and potential as a biomarker. *Precambrian Research*, **118**:221-241.
142. Manning C.E., Mojzsis S.J., and Harrison T.M. 2006. Geology and age of supracrustal rocks, Akilia Greenland. *Am. J. Sci.* **306**:303-366.
143. McKeegan K.D., Kudryavtsev A.B. and Schopf W.J. 2007. Raman and ion microscopic imagery of graphitic inclusions in apatite from older than 3830 Ma Akilia supracrustal rocks, West Greenland. *Geology*, **35**(7):591-594.
144. Papineau D., De Gregorio B.T., Cody G.D., Fries M.D., Mojzsis S.J., Steele A., Stroud R.M., Fogel M.L. 2010. Ancient graphite in the Eoarchean quartz–pyroxene rocks from Akilia in southern West Greenland I: Petrographic and spectroscopic characterization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **74**:5862–5883.
145. Eiler J.M. 2007. The oldest fossil or just another rock? *Science* **317**: 1046-1047.
146. Kulakovskaya T.V., Vagabov V.M., and Kulaev I.S. 2012. Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine – modern state and outlook. *Process Biochemistry*. **47**:1-10.
147. Harold F. (1966) Inorganic Polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Reviews*. **30**(4):772-794.
148. Kornberg A., Rao N.N., and Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. 1999. *Annual Review of Biochemistry*. **68**:89-125.
149. Kulaev I.S., Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V., Lichko L.P., Andreeva N.A., and Trilisenko L.V. 2000. The development of A.N. Belozersky's ideas in polyphosphate biochemistry. *Biochemistry (Moscow)*, **65**(3):271-278.
150. (18) Kulaev I.S., Vagabov V.M., and Kulakovskaya T.V. 2004. *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphate*. Second edition. John Wiley and Sons, Ltd.
151. Varela Ch., Mauriaca C., Albar J.P., Jerez C.A., and Chávez F.P. 2010. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiology*, **10**(7), 14 pp.
152. Brown MR. and Kornberg A. 2008. The long and short of it – polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem. Sci.* **33**(6):284-290.
153. Rao N.N., Gómez-García M.R., and Kornberg A. 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*. **78**:605-647
154. Omelon S.J., and Grynpas M.D. 2008. Relations between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization. *Chem. Rev.* **108**:4694-4715.
155. Reusch, R.N. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in Eukaryotic membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **191**:377–381.
156. Jones, H.E., Holland I.B., Jacq I.B., Wall T., and Campbell A.K. 2003. *Escherichia coli* lacking the AcrAB multidrug efflux pump also lacks nonproteinaceous, PHB–polyphosphate Ca²⁺ channels in the membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1612**:90–97.
157. Kim K.-S., Rao N.N., Fraley C.D., and Kornberg A. 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp.

158. McInerney P, Mizutani T, Shiba T. 2006. Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity in vitro and in vivo. *Mol. Microbiol.* **60**(2):438-47.
159. Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., and Kornberg A. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* **293**:705-708.
160. Negoda A., Negoda E., Xian M., and Reusch R.N. 2009. Role of polyphosphate in regulation of the *Streptomyces lividans* KcsA channel. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**: 608-614.
161. Wang L., Fraley C.D., Faridi J., Kornberg A., and Roth R.A. 2003. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:11249-11254.
162. Smith S.A., Mutch N.J., Baskar D., Rohloff P., Docampo R., and Morrissey J.H. 2006. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**:903-908.
163. Lorenz B., Munkner J., Oliveira M.P., Kuusksalu A., Leitao J.M., Muller W.E., and Schroder H.C. 1997. Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1335**:51-60.
164. Hernandez-Ruiz L., Gonzalez-Garcia I., Castro C., Brieva J.A., and Ruiz F.A. 2006. Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. *Haematologica*, **91**:1180-1186.
165. Campos E., Façanha A.R., osta E.P., Fraga A., Moraes J., da Silva Vas J., Masuda A. and Logullo C. 2011. A mitochondrial membrane exopolyphosphatase is modulated by, and plays a role in, the energy metabolism of hard tick *rhhipicephalus (Boophilus) microplus* embryos. *Int. J. Mol. Sci.*, **12**:3525-3535
166. Pavlov E., Aschar-Sobbi R., Campanella M., Turner R.J., Gomez-Garsia M.R., and Abramov A. 2010. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **285**(13):9240-9248.
167. Pavlov E., Zakharian E., Biaden Ch., Diao C.T.M., Grimply C., Reusch R.N., and French R. 2005. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction. *Biophysical Journal* **88**:2614-2625.
168. Abramov A.Y., Fraley C., Diao C.T., Winkfein R., Colicos M.A., Duchen M.R., French R.J., and Pavlov E. 2007. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(46):18091-18096.
169. Brown M.R. and Kornberg A. 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **101**:16085-16087.
170. Phillips N.F.B., Hsien P.C., and Kowalczyk T.H. 1999. Polyphosphate glucokinase., in *Inorganic Polyphosphates, Biochemistry, Biology, Biotechnology*. (Schroder H.C., and Muller W.G.E., eds.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N. Y., pp. 101-127.
171. Mukai T., Kawai S., Mori S., Mikami B., and Murata K. 2004. Crystal structure of bacterial inorganic polyphosphate/ATP-glucomannokinase. Insights into kinase evolution. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**(48):50591-600.
172. Streckfuss J.L., Smith W.N., Brown L.R., and Campbell M.N. 1974. Calcification of selected strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sangius*. *Journal of Bacteriology*, **120**(1):502-506.
173. Moorer W.R., Ten Cate J.M., and Buijs J.F. 1993. Calcification of a Cariogenic *Streptococcus* and of *Corynebacterium (Bacterionema) matruchotii*. *Journal of Dental Research*, **72**(6):1021-1026.
174. Ennever J., Vogel J.J., and Brown L.L. Jr. 1972. Survey of Microorganisms for Calcification in a Synthetic Medium. *Journal of Dental research*, **51**(5):1483-1486.
175. Ennever J., Vogel J.J., and Streckfuss J.L. 1974. Calcification by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **119**(3):1061-1062.
176. Omelon S.J., and Grynypas M.D. 2008. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite mineralization. *Chem. Rev.*, **108**:4694-4715.
177. Benzerara K., Yoon T.H., Tyliczszak T., Constantz B., Spormann A.M., and Brown G.E. Jr. 2004. Scanning transition X-ray microscopy study of microbial calcification. *Geobiology*, **2**:249-259
178. Ennever J., Vogel J., and Takazoe I. 1968. Calcium binding by a lipid extract of *Bacterionema matruchotii*. *Calc. Tiss. Res.* **2**:296-298.
179. van Dijk S., Dean D.D., Liu Y., Zhao Y., Chirgwin J.M., Schwartz Z., and Boyan B.D. 1988. Purification, amino acid sequence, and cDNA sequence of a novel Calcium-precipitating proteolipid

- involved in calcification of *Corynebacterium matruchotii*. *Biomedical and Life Sciences. Calcified Tissue International*, **62**(4):350-358.
180. Takazoe I., and Itoyama T. 1980. Analytical electron microscopy of *Bacterionema matruchotii* calcification. *Journal of Dental Research*, **59**(6):1090-1094.
 181. Boyan-Saliers B.D., Vogel J.J., and Ennever J. 1978. Pre-apatitic mineral deposition in *Bacterionema matruchotii*. *Journal of Dental Research*, **57**(2):291.
 182. Ennever J., and Vogel J.J. 1981. Magnesium inhibition of apatite nucleation by proteolipid. *Journal of Dental Research*, **60**(4):838-841.
 183. Pestov N.A., Kulakovskaya T.A., and Kulaev I.S. 2004. Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Res.* **4**(6):643-648.
 184. Peverly J.H., Miller R.J., Malone C., and Koeppe D.E. 1974. Ultrastructural evidence for calcium phosphate deposition by isolated corn shoot mitochondria. *Plant Physiol.* **54**:408-411.
 185. Silver B.B., and Sordahl L.A. 1980. Magnesium modulation of calcium uptake in cardiac mitochondria: An ultrastructural study. In *Magnesium in Health and Disease*, pp 507-513.
 186. Kapustin A., Galkin A., Furmanik M., Alvarez-Hernandez D., and Shanahan C. 2011. Elevated calcium and phosphate impair mitochondrial function in calcifying human vascular smooth muscle cell. *Heart.* **97**(24).
 187. Bonucci E., Derenzini M., and Marinozzi V. 1973. The organic-inorganic relationship in calcified mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, **59**:185-211.
 188. Tew W. P., Malis C. D., Howard J. E., and Lehninger A. L. 1981. Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**(9):5528-5532.
 189. Jacob W. A., Bakker A., Hertsens r.C., and Blermans W. 1994. Mitochondrial matrix granules: Their behavior during changing metabolic situations and their relationship to contact sites between inner and outer mitochondrial membranes. *Microscopy Research and Technique*, **27**(4):307- 318.
 190. Sutfin L.V., Holtrop M.E., and Ogilvie R.E. 1971. Microanalysis of individual mitochondrial granules with diameters less than 1000 angstroms. *Science* **174**(4012):947-949.
 191. Wroblewski J, Wróblewski R, Mory C, Colliex C. 1991. Elemental analysis and fine structure of mitochondrial granules in growth plate chondrocytes studied by electron energy loss spectroscopy and energy dispersive X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 1991 Sep;5(3):885-892.
 192. Barnard T. and Ruusa J. Mitochondrial matrix granules in soft tissues: I. Elemental composition by X-ray microanalysis. *Experimental Cell Research*, **124**(2): 339-347.
 193. Dieter Brdiczka D. and Barnard T. Mitochondrial matrix granules in soft tissues: II. Isolation and initial characterization of a calcium-precipitable, soluble lipoprotein subfraction from brown fat and liver mitochondria. *Experimental Cell Research* **126** (1):127-135.
 194. Kawahara I., Koide M., Tadokoro O., Udagawa N., Nakamura H., Takahashi N., and Ozawa H. 2009. The relationship between calcium accumulation in osteoclast mitochondrial granules and bone resorption. *Bone*, **45**(5):980-986.
 195. Landis W.J., and Glimcher M.J. 1978. Electron diffraction and electron probe microanalysis of the mineral phase of bone tissue prepared by anhydrous techniques. *Journal of Ultrastructure Research*, **63**(2):188-203.
 196. Saetersdal T.S., Myklebust R., Berg Justesen N. -P., Engedal H. and Cato Olsen W. 1977. Calcium containing particles in mitochondria of heart muscle cells as shown by cryo-ultramicrotomy and X-ray microanalysis. *Cell and Tissue Research*, **182**(1):17-31.
 197. Bernal J.D. 1949. The physical basis for life. *Proc. Phys. Soc.* **62**:537-558.
 198. Ozawa H. and Yamamoto T. An application of energy-dispersive X-ray microanalysis for the study of biological calcification. 1983. *The Journal of Histochemistry and cytochemistry*, **31**(1A):210-213.
 199. Sayegh F.S., Davis R.W. and Solomon G.C. 1974. Mitochondrial role in cellular mineralization. *Journal of Dental research*, **53**(3):581-587.
 200. Plachot J.J., Thil C.L., Enault G., Halpern s., Cournot-Witmer G. and Balsan S. 1986. Mitochondrial calcium and bone mineralization in the rat fetus. *Bone Miner.*, **1**(2):157-166.
 201. Lynn, W. S., and Brown R.H. 1963. Synthesis of polyphosphate by rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**:367-371.
 202. Kulakovskaya T.V., Lichko L.P., Vagabov V.M., and Kulaev I.S. 2010. Inorganic

- polyphosphate in mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*. **75**(7):825-831.
203. Anderson S.G/E., Zomorodipour A., Anderson J.O., Sicheritz-Pontén Th., Alsmark U.C.M., Podowski R.M., Näslund A.K., Eriksson A.-S., Winkler H.H., and Kurland Ch.G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, **396**:133-143.
 204. Müller M., and Martin W. 1999. The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *BioEssays*, **21**:377-381.
 205. Misra D.N. 1986. Adsorption of benzoic acid on pure and cupric ion-modified hydroxyapatite: Implications for design of a coupling agent to dental polymer composites. *J Dent Res*, **65**:706-711.
 206. Martin W. 2005. The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends in Microbiology*, **13**(10) 2005, 3 pages, available online at www.sciencedirect.com.
 207. Lithgow T., and Schneider A. 2010. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **365**:799-817.
 208. Tachezy J., Sánchez L.B., and Müller M. 2001. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol. Biol. Evol.*, **18**(10):1919-1928.
 209. Bui E.T.N., Bradley P.J., and Johnson P.J. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9651-9656.
 210. Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. and Moreno S.N.J. 2005. Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nat.Rev. Microbiol.* **3**(3):251-261.
 211. Benchimol M. 1999. The hydrogenosome. *Acta Microscopica*, **8**(1):1-22.
 212. Chapman A., Han Ao C., Linstead D., and Lloyd D. 1985. Energy-dispersive X-ray microanalysis of membrane-associated inclusions in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. *Journal of General Microbiology*, **131**:2933-2939.
 213. Seufferheld M.J., Kim K.M., Whitfield J., Valerio A., and Caetano-Anollés. 2011. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. *Biology Direct*, **6**:50, 15 pages.
 214. Docampo R., Ulrich P., and Moreno S.N.J. 2010. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Phil. Trans. R. Soc. B* **65**:775-784.
 215. Seufferheld M., Lea Ch. R., Vieira M., Oldfields E. and Docampo R. 2004. The H-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(3):51193-51202.
 216. Ruiz F.A., Marchesini N., Seufferheld M., Govindjee and Docampo R. 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamidomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(49, issue 7):46196-48203.
 217. Seufferheld M., Vieira M.C.F., Ruiz F.A., Rodrigues C.O., Moreno S.N.J., Docampo R. 2003. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(32):29971-29978.
 218. Ramos I.B., Miranda K., Ulrich P., Ingram P., LeFurgey A., Machado E.A., de Souza W., Docampo R. 2010. Calcium- and polyphosphate- containing acidocalcisomes in chicken egg yolk. *Biol. Cell*. **102**(7):421-434.
 219. Ramos I., Gomes F., Koeller C.M., Saito K., Heise N., Masuda H., Docampo R., de Souza W., Machado E.A., and Miranda K. 2011. Acidocalcisomes as calcium- and polyphosphate-storage compartments during embryogenesis of the insect *Rhodnius prolixus* stahl. *PLoS ONE* **6**(11): e27276, 11 pages.
 220. Werner F. and Grohmann D. 2011. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol.*, **9**(2):85-98.
 221. Alba M.M. 2001. Replicative DNA polymerases. *Genome Biology*, **2**(1):reviews3002.1-3002.4.
 222. Fillbe J., Forterre P., Sen-Lin T. and Laurent J. 2002. Evolution of DNA polymerase families: Evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J Mol Evol*, **54**:763-773.
 223. Leipe D.D., Aravind L. and Koonin E.V. 1999. Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic Acids Research*, **27**(17):3389-3401.
 224. Proshkina G.M., Shematorova E.K., Proshkin S.A., Zaros C., Thuriaux P. and Shpakovski G.V. 2006. Ancient origin, functional conservation and fast evolution of DNA-dependent RNA

- polymerase III. *Nucleic Acids Research*, **34**(13):3615-3624.
225. Antifreeze proteins. *Protein Data Bank* ([wwPDB](http://www.PDB); www.wwpdb.org).
 226. Goodman M.F. Hydrogen bonding revisited: Geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:10493-10495.
 227. Bruskov V. I. and Poltev V. I. 1979. On molecular mechanisms of nucleic acid synthesis. Fidelity aspects: 2. Contribution of protein – nucleotide recognition. *J. Theor. Biol.*, **78**:29-41.
 228. Engel J. D. and von Hippel P. H. 1978. D(M6ATP) as a probe of the fidelity of base incorporation into polynucleotides by Escherichia coli DNA polymerase I. *J. Biol.Chem.*, **253**:935-939.
 229. Sloane D. L., Goodman M. F. and Echols H. 1988. The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Nucleic Acids Res.*, **16**:6465–6475.
 230. Moran S., Ren R. X.-F., Squire Rumney IV and Kool E.T. 1997. Difluorotoluene, a nonpolar isostere for thymine, codes specifically and efficiently for adenine in DNA replication. *J Am Chem Soc.*, **19**(8): 2056-2057.
 231. Moran S., Ren R. X.-F. and Kool E.T. 1997. A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:10506-10511.
 232. Guckian K.M., Krugh Th.R. and Kool E.T. 1998. Solution structure of a DNA duplex containing a replicable difluorotoluene-adenine pair. *Nature. Structural & Molecular Biology*, **5**:954-959.
 233. Liu D., Moran S. and Kool E. T. 1997. Bi-stranded, multisite replication of a base pair between difluorotoluene and adenine: confirmation by ‘inverse’ sequencing. *Chemistry & Biology*, **4**(12):919-926.
 234. Pallan P.S. and Egli M. 2009. The pairing geometry of the hydrophobic thymine analog 2,4-difluorotoluene in duplex DNA as analyzed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc*, **131**(35): 12548–12549.
 235. Koonin Eu.V. 2006. Temporal order of evolution of DNA replication systems inferred by comparison of cellular and viral DNA polymerases. *Biology Direct* 2006, **1**:39.
 236. Rothwell P.J. and Waksman G. 2005. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry*, **71**:401-440.
 237. Steitz Th.A. 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(25)17395-17398.
 238. Tahirov T.H., Makarova K.S., Rogozin I.B., Pavlov Y.I., and Koonin Eu.V. 2009. Evolution of DNA polymerases: an inactivated polymerase-exonuclease module in Pol ε and a chimeric origin of eukaryotic polymerases from two classes of archaeal ancestors. *Biology Direct* 2009, **4**:11.
 239. Forterre P. 2005. The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world: a story of viruses and cells. *Biochimie* **87**:793-803.
 240. Plattner H. and Klauke N. 2001. Calcium in ciliated Protozoa: Sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. *International Review of Cytology*, **201**:115-208.
 241. Nilsson J. R. and Coleman J.R. 1977. Calcium-rich, refractive granules in *Tetrahymena pyriformis* and their possible role in the intracellular ion-regulation. *J. Cell Sci.* **24**:311-325.
 242. H. Rosenberg 1966. The isolation and identification of “ volutin ” granules from *Tetrahymena*. *Experimental Cell Research Volume* 41(2):397-410.
 243. Munk N and Rosenberg H. 1969. On the deposition and utilization of inorganic pyrophosphate in *Tetrahymena pyriformis*. . *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects* **177**(3): 629-640.
 244. Coleman J.R., Nilsson J. R., Warner R.R. and Batt P. 1972. Qualitative and quantitative electron probe analysis of cytoplasmic granules in *Tetrahymena pyriformis* . *Experimental Cell Research*. **74**(1): 207-219.
 245. Gobbi L., Albertini G., . Lucarini G, Carboni V., Marangoni R., and Colombetti G. 1994. Identification of calcium and phosphorus binding sites in the heterotrich ciliate *Blepharisma japonicum*. *Micron*, **25**(2):135-139.
 246. Grover J.A., Rope A.F. and Kaneshiro E.S. 1997. The occurrence of biogenic calcian struvite, (Mg,Ca)NH₄PO₄·6H₂O, as intracellular crystals in *Paramecium*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44**:366-373.
 247. Ruffolo J. J. JR. 1978. Intracellular calculi of the ciliate protozoan *Euplotes eurystomus*: Morphology, localization, and possible stages in formation. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **97**:381-386.
 248. Pautard F.G.E. 1959. Hydroxyapatite as a developmental feature of *Spirostomum ambiguum*

- Biochimica et Biophysica Acta*, **35**:33-46.
249. Takagui R.R., and Silveira M. 1999. Studies of the Ossicles from the Ciliate Protozoan *Spirostomum ambiguum*. *Jpn. J. Appl. Phys.* **38**:5303-5304.
 250. Osborn, D. and Hamilton, T. C. 1977. Electron microbeam analysis of calcium distribution in the ciliated protozoan, *Spirostomum ambiguum*. *Journal of Cellular Physiology*, **91**: 409-416.
 251. Watabe, N. 1990. Calcium phosphate in invertebrates and protozoans. *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends* (ed. by J.G. Carter). Van Nostrand Reinhold. New York, pp. 35-44.
 252. Griffith E.J. 1992. In search of a safe mineral fiber. *Chem. Tech.* **22**:220-226.
 253. Yucelen G. I., Kang D.-Y., Guerrero-Ferreira R. C., Wright E. R., Beckham H. W., and Nair S. 2012. Shaping single-walled metal oxide nanotubes from precursors of controlled curvature, *Nano Letters*, **12**(2):827-832.
 254. Väänänen H.K., Morris D.C., Anderson H.C. 1983-1984. Calcification of cartilage matrix in chondrocyte cultures derived from rachitic rat growthplate cartilage. *Metabolic Bone Disease and Related Research* **5**(2):87-92.
 255. Landis W.J. and Glimcher M.J. Electron optical and analytical observations of rat growth plate cartilage prepared by ultracryomicrotomy: The failure to detect a mineral phase in matrix vesicles and the identification of heterodispersed particles as the initial solid phase of calcium phosphate deposited in the extracellular matrix. *Journal of Ultrastructure Research*, **78**(3):227-268.
 256. Hall B.K. 2005. *Bones and Cartilage. Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. Elsevier Academic Press.
 257. Anderson H.C. 1995. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res.* **314**:266-280.
 258. Anderson H.C. 2003. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*, **5**(3):222-226.
 259. Prescott D.M. 2000. Genome gymnastics: Unique modes of DNA evolution and processing in ciliates. *Nature Reviews: Genetics*. 1:191-198.
 260. Herrick G. 1994. Germline-soma relationships in ciliated protozoa: the inception and evolution of nuclear dimorphism in one-celled animals. *Sem Dev Biol* **5**:3-12.
 261. Doak T. G., Herrick G., Landweber L. F. and Weiss R.B. Sequence of the *Oxytricha trifallax* macronuclear genome. (*Available online*.)
 262. Chalker D.L. 2008. Dynamic nuclear rearrangement during genome remodeling of *Tetrahymena*. *Biophys Biophys Acta*, **1783**(11):2130-2136.
 263. Chalker D.L. and Yao M.-Ch. 2011. DNA elimination in ciliates: Transposon domestication and genome surveillance. *Annu. Rev. Genet.*, **45**:227-246.
 264. Klobutcher A. and Herrick G. 1997. Developmental genome reorganization in ciliated protozoa: the transposon link. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* , **56**:1-62.
 265. Prescott D.M. 1999. The evolutionary scrambling and developmental unscrambling of germline genes in hypotrichous ciliates. *Nucleic Acids Research*, **27**(5):1243-1250.
 266. Nowacki M., Shetty K. and Landweber L.F. 2011. RNA-mediated epigenetic programming of genome rearrangements. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, **22**(12):367-389.
 267. Soldo A.T., Brickson S.A., Larin F. 1981 The kinetic and analytical complexities of the DNA genomes of certain marine and fresh-water ciliates. *J. Protozool* **28**:377-383.
 268. Huang J. and Katz L.A. 2014. Nanochromosome copy number does not correlate with DNA levels though patterns are conserved between strains of the ciliate morphospecies *Chilodonella uncinata*. *Protist* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2014.04.005>
 269. Riley J.L. and Katz L.A. 2001. Widespread distribution of extensive chromosomal fragmentation in ciliates. *Mol. Biol. Evol.* **18**(7):1372-1377.
 270. Nowacki M., Higgins B.P., Maquilan G.M., Swart E.C., Doak T.G. and Landweber L.F. 2009. A function role for transposases in a large eukaryotic genome. *Science*, **324**(5229):935-938.
 271. Wang M. and Caetano-Annoles G. 2009. The evolutionary mechanics of domain organization in proteomes and the rise of modularity in the protein world. *Structure*, **17**:66-78.
 273. Seufferheld M.J., Kim K.M., Whitfield J., Valerio A., and Caetano-Anollés. 2011. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. *Biology Direct*, **6**:50, 15 pages.

274. Okazaki J., Embery G., Hall R.C., Huges Wassel D.T., Waddington R.J. and Kamada A. 1999. Adsorption of glycosaminoglycans onto hydroxyapatite using chromatography. *Biomaterials* **20**:309-314.
275. Rees S.G., Hughes Wassell D.T. and Embery G. 2002. Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. *Biomaterials* **23**: 481-489.
276. Ng P., He J., Cohen A. *How CHT Ceramic Hydroxyapatite Works*. Bio-Rad Laboratories, Inc., Tech note 5518. Hercules, CA 94547 USA
277. Gagnon P. *An Enigma Unmasked: How Hydroxyapatite Works, and How to Make it Work For You*. Validated Biosystems, Inc.
278. Kawasaki T. 1991. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J Chromatogr A* **544**:147-184.
279. Paul K. Ng P.K., Gagnon P. and Aberin Ch. 2005. Differential retention of DNA on Ceramic Hydroxyapatite and Ceramic Fluoroapatite. Presented at: 18th International Symposium, Exhibit and Workshops on Preparative Process Chromatography, Philadelphia, May 9 2005. Copies available at Valerie_McLaughlin@bio-rad.com
280. Gorbunoff M.J. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite. I : Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry* **136**:425-432.
281. Gorbunoff M.J. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite. II : Role of protein acidic and basic group. *Analytical Biochemistry* **136**:433-439.
282. Gorbunoff M.J. and Timasheff S. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite: Mechanism. *Analytical Biochemistry* **136**:440-445.
283. Kawasaki T. 1991. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J Chromatogr A* **544**:147-184.
284. Neuman W.F. and Neuman M.W. 1958. *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*. Chicago, University of Chicago Press, 209 pp.
285. Dorozhkin S.V. 2009. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. *Materials*, **2**:1975:2045.
286. Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H. and Barroug A. 2007. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering C*, **27**(2):198-205.
287. Leventouri Th. 2006. Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions. **27**:3339-3342.
288. Eichert D., Salome M, Banu M., Susini J. and Rey C. 2005. Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* **60**(6):850-858.
289. Rey C., Combes C., Drouet C. and Glimcher M.J. 2009. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis Int.* **20**(6):1013-1021.
290. Jäger Ch., Welzel Th., Meyer-Zaika W. and Eppie M. 2006. A solid state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite. *Magnetic Resonance in Chemistry*; **44**:573-580.
291. Wilson EE, Awonusi A, Morris MD, Kohn DH, Tecklenburg M.M. and Beck L.W. 2005. Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance. *J Bone Miner Res.*; **20**(4):625-634.
292. Roveri N., Battistella E., Bianchi C. L., Foltran I., Foresti E., Iafisco M., Lelli M. Naldoni A., Palazzo B. and Rimondini L. 2009. Surface enamel remineralization: Biomimetic apatite nanocrystals and fluoride ions different effects. *Journal of Nanomaterials*; Vol. 2009, Article ID 746383, 9 pages.
293. D.N. 1993. Adsorption of low-molecular-weight sodium polyacrylate on hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* **72**(10):1418-1422.
294. Brown W.E. 1962. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: Crystal structure of octacalcium phosphate. *Nature* **196**:1048-1050.
295. Mathew M. Brown W.E. Schroeder L.W. and Dickens B. 1998. Crystal structure of octacalcium bis(hydrogenphosphate) tetrakis(phosphate) pentahydrate, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **18**:235-250.
296. Mathew M. and Tagaki Sh. 2001. Structures of biological minerals in dental research. *J. Res.Natl Inst. Stand. Technol.* **106**:1035-1044.

297. Drouet Ch., Carayon M-Th. Combes Ch. and Rey Ch. 2008. Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg^{2+} and Sr^{2+} : A preamble to the activation of bone repair minerals. *Materials Science and Engineering C*, **28**(8):1544-1550.
298. Iijime M. Formation of octacalcium phosphate in vitro. *Monogr. Oral. Sci.*, **18**:17-49.
299. Suvorova E. I. and Buffat P. A. 2001. Electron diffraction and high resolution transmission electron microscopy in the characterization of calcium phosphate precipitation from aqueous solutions under biomineralization conditions. *European Cells and Materials*, **1**:27-42.
300. Brown W.E. , Schroeder Le-R.W. and Ferris J.S. 1979. Interlayering of crystalline octacalcium phosphate and hydroxylapatite. *J. Phys. Chem.*, **83**(11):1385-1388.
301. Nelson D. G. A. and Barry J. C. 1989. High resolution electron microscopy of nonstoichiometric Apatite crystals. *The Anatomical Record*; **224**(2):265-276.
302. Iijima M. Tohda H. and Moriwaki Y. 1992. Growth and structure of lamellar mixed crystals of octacalcium phosphate and apatite in a model system of enamel formation. *Journal of Crystal Growth*, **116**(3-4):319-326.
303. Iijima M., Tohda H., Suzuki H., Yanagisawa T. and Moriwaki Y. 1992. Effects of F- on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation. *Calcif. Tissue Int.* **50**(4):357-361.
304. Brown W.E., Mathew M. and Chow L.C. 1984. Roles of octacalcium phosphate in surface chemistry of apatites, *Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite*, D.N. Misra, ed., Plenum (1984).
305. Roveri N., Foresti E., Lelli M., Lesci I. G. and Marchetti M. Microscopic investigations of synthetic biomimetic hydroxyapatite. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*; **3**:1868-1879.
306. Eichert D., Combes C., Drouet C. and Rey C. 2005. Formation and evolution of hydrated surface layers of apatites. *Bioceramics*, L. Panjian K. Zhang C.W. Colwell Jr., **17** (2005) 3-6.
307. Nazari Ghafari ., Tahari A., Moztarzadeh F., Mozafari M. and Bahrololoom M.E. 2011. Ionexchange behaviour of silver-doped apatite micro- and nanoparticles as antibacterial biomaterial. *Micro & Nano Letters*, **6**(8):713-717.
308. Pak Ch.Y.C. and Diller E.C. 1969. Ionic interaction with bone mineral. V. Effect of Mg^{2+} , citrate³⁻, F- and SO_4^{2-} on the solubility, dissolution and growth of bone mineral. *Calc. Tiss. Res.* **4**:69-77.
309. Burton F.G., Neuman M.W. and Neuman W.F. 1969. On the possible role of crystals in the origins of life. I. The absorption of nucleosides, nucleotides and pyrophosphate by apatite crystals. *Currents in Modern Biology*, **3**:20-26.
310. Rey C., Combes C., Drouet C., Farlay D., Panczer G., Rey Ch., Delmas P. and Bolvin G. 2010. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab.* **28**(2) 433-445.
311. Roveri N., Battistella E., Bianchi C. L., Foltran I., Foresti E., Iafisco M., Lelli M. Naldoni A., Palazzo B. and Rimondini L. 2009. Surface enamel remineralization: Biomimetic apatite nanocrystals and fluoride ions different effects. *Journal of Nanomaterials*; Vol. 2009, Article ID 746383, 9 pages.
312. Doss S.K. 1976. Surface properties of hydroxyapatite : I. The effect of various inorganic ions on the electrophoretic behavior. *J. Dent. Res.*, **55**(6):1067-1075.
313. Knowles J.C., Callcut S., Georgiou G. 2000. Characterization of the rheological properties and zeta potential of a range of hydroxyapatite powders. *Biomaterials* **21**:1387-1392.
314. Corno M., Busco C., Bolis V., Tosoni S. and Ugliengo P. 2009. Water adsorption on the stoichiometric (001) and (010) surfaces of hydroxyapatite: a periodic B3LYP study. *Langmuir*; **25**(4):2188-98.
315. Amrah-Bouali S., Rey C., Lebugle A. and Bernache D. 1994. Surface modifications of Hydroxyapatite ceramics in aqueous media. *Biomaterials*; **15**(4):269-272.
316. Corno M., Busco C., Bolis V., Tosoni S. and Ugliengo P. 2009. Water adsorption on the stoichiometric (001) and (010) surfaces of hydroxyapatite: a periodic B3LYP study. *Langmuir*; **25**(4):2188-98.
317. Brown P.W. and Martin R. I. 1999. An analysis of hydroxyapatite surface layer formation. *The Journal of Physical Chemistry B* **103** (10):1671-1675.
318. Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D. and Thomas P. 2002. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials* **23**:1065-1072.
319. Wang L. and Nancollas G.H. 2008. Calcium orthophosphates: Crystallization and dissolution. *Chem*

- Rev* **108**(11):4628-4669.
320. Williams G. and Sallis Jh. D. 1982. Structural factors influencing the ability of compounds to inhibit hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int* **34**:1699-177.
 321. Nancollas G.H., Tag R., Phipps R.J., Henneman Z., Gulde S., Wu W., Mangood A. Russel R.G. and Ebetino F.H. 2006. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* **38**:617-627.
 322. Williams G. and Sallis Jh. D. 1979. Structure-activity relationship of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* **184**:181-184.
 323. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with other polyphosphates. *Urol Res* **28**:136-140.
 324. Russell R.G.G., Mühlbauer R.C., Bisaz S., Williams D.A. and Fleisch H. 1970. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calc. Tiss. Res.* **6**:183-196.
 325. Henneman Z. J., Nancollas G. H., Ebetino F. H., Russell R. G. G., and Phipps R. J. 2008. Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* **85**(4): 993–1000.
 326. Lawson M.A., Xia Z., Barnett B.L., Triffitt J.T., Phipps R.J., Dunford J.E., Locklin R.M., Ebetino F.H. and Russel R.G.G. 2010. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **92**(1):149-155.
 327. Lomashvili K.A., Cobbs S., Hennigar R.H., Hardcastle K.I. and O'Neill Ch. 2004. Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* **15**:1392-1402.
 328. Jung A., Bisaz S. and Fleisch H. 1973. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc. Tiss. Res.* **11**:269-280.
 329. Robertson W.G. and Morgan D.B. 1971. Effect of pyrophosphate on the exchangeable calcium pool of hydroxyapatite crystals. *Biochim. Biophys. Acta*, **230**:495-503.
 330. Jung A., Bisaz S. Bartholdi P. and Fleisch H. 1973. Influence of pyrophosphate on the exchange of calcium and phosphate ions on hydroxyapatite. *Calcif. Tiss. Res.* **13**:27-49.
 331. McGaughey C. 1983. Binding of polyphosphates and phosphonates to hydroxyapatite, subsequent hydrolysis, phosphate exchange and effects on demineralization, mineralization and microcrystal aggregation. *Caries Research* **17**(3):229-241.
 332. Davis N.L. 1977. *Investigations into the Structure of Biologically Important Molecules*. Thesis, 86 pages. California Institute of Technology, Pasadena, California.
 333. Varga T., Wilkinson A.P., Haluska M.S. and Payzant E.A. 2005. Preparation and thermal expansion of $(M_{0.5}^{III}M_{0.5}^{IV})P_2O_7$ with the cubic ZrP_2O_7 structure. *Journal of Solid State Chemistry* **178**:3541-3546.
 334. Кисловский Л.Д., Кнубовец Р.Г., Черенкова Г.И. 1977. Признаки конденсации тетраэдров в структуре апатита. *ДАН СССР*, **232**(3):1280-1282.
 335. Кнубовец Р.Г., Портнов Ф.М., Черенкова Г.И. 1978. Полимерная фосфатная группа в Малофтористом апатите. *ДАН СССР*, **243**(5) :581-583.
 336. Rothwell W.P., Waugh J.S., Yesinovski J.P. 1980. High resolution variable temperature ^{31}P NMR of solid calcium phosphates. *J. Amer. Chem. Soc.* **102**(8)2637-2643.
 337. Kandori K., Tsuyama S., Tanaka H. and Ishikawa T. 2007. Protein adsorption characteristics of calcium hydroxyapatites modified with pyrophosphoric acids. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **58**(2):98-104.
 338. Moreno E, C., Kresak M. and Gaffar A. 1994. Adsorption of peroxydiphosphate onto hydroxyapatite: Kinetics, thermodynamics, and crystal growth inhibition. *Journal of Colloid and Interface Science*, **168**(1):173–182 .
 339. Fleisch H. 1998. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Reviews* **19**(1):80-100.
 340. Russel R.G.G., Watts N.B., Ebetino F.H. and Rogers M.J. 2008. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis Int.* **19**:733-759.
 341. Barney, R. J. 2010. *Synthesis and biological evaluation of novel phosphonates*. Dissertation, University of Iowa, <http://ir.uiowa.edu/etd/778>.

342. Mukherjee S., Song Y., Oldfield E. 2008. NMR investigations of the static and dynamic structures of bisphosphonates on human bone: a molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **130**:1264-1273.
343. Mukherjee S., Huang C. Guerra F. Wang K. and Oldfield E. 2009. Thermodynamics of Bisphosphonates binding to human bone: A two-site model. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(24):8374-8375.
344. Josse S , Faucheux C., Soueidan A., Grimandi G., Massiot D., Alonso B., Janvier P., Laïb S., Pilet P. Gauthier O., Daculsi G., Guicheux J.J. , Bujoli B. and Bouler J.M. 2005. Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. *Biomaterials.* **26**(14):2073-2080.
345. Pascaud P, Bareille R, Bourget C, Amédée J, Rey C, Sarda S. 2012. Interaction between a bisphosphonate, tiludronate and nanocrystalline apatite: in vitro viability and proliferation of HOP and HBMSC cells. *Biomed Mater.* **7**(5):054108.
346. Jarvis M.F., Burns C.J., Pauls H.W., Assal A., Kin J.S., Cheney D.L. and Youssefyeh R.D. 1993. Characterization of the bisphosphonate recognition site on hydroxyapatite using radioligand binding Techniques with [¹⁴C]citric acid. *Calcif Tissue Int* **52**:372-377.
347. Stephanie Leavitt S. and Freire E. 2001. Direct measurement of protein binding energetics by Isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**(5):560-566.
348. Bonicci E. 2012. Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience* **17**:100-128.
349. Mukherjee S., Huang C. Guerra F. Wang K. and Oldfield E. 2009. Supporting Information. https://chad.scs.uiuc.edu/docs/PDF/1268256600_348SI.pdf
350. Maltezos E., Stylianou M., Roy S., Drouza C., and Keramidias A. D. 2010. Synthesis, solution, and structural characterization of tetrahydrofuranyl-2,2-bisphosphonic acid disodium salt. *Bioinorganic Chemistry and Applications* Volume 2010, Article ID 563875, 7 pages.
351. Rill Ch., Kolar Z. I., Kickelbick G., Wolterbeek H. Th. and Peters J. A. 2009. Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [¹⁶⁰Tb]Terbium complexes of the bone-targeting ligands DOTP and BPPED. *Langmuir*, **25**(4):2294–2301.
352. Sallis J.D., Demadis K.D. and Cheung H.S. 2006. Phosphocitrate, a potential therapeutic agent for calcium crystal deposition diseases. *Current Rheumatology Reviews*, **2**(1): 95-99.
353. Lehninger R.H. The possible role of mitochondria and phosphocitrate in biological calcification. 1982. In: *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*. Westbrook P. (ed), pp. 107-122. Riedel Publishing Company.
354. Sallis J.D., Demadia K.D. and Cheung H.S. 2006. Phosphocitrate, A potential therapeutic agent for calcium crystal deposition diseases. *Current Rheumatology Reviews*, **2**:95-99.
355. Tew W.P., Malis C.D., Howard J.E. and Lehninger A.L. 1981. Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(9):5520-5532.
356. Hu Y.-Y., Rawal A. and Schmidt-Rorh K. 2010. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(52):22425-22429.
357. Jonsson M., Richardson C.F., Sallis J.D. and Nancollas J.H. 1991. Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* **49**:134-137.
358. Misra D.N. 1996. Interaction of citric acid with hydroxyapatite: surface exchange of ions and precipitation of calcium citrate. *Journal of dental research*, **75**(6):1418-1425.
359. Wierzbicki A. and Cheung H.S. 2000. Molecular modeling of inhibition of hydroxylapatite by phosphocitrate. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **529**:73-82.
360. Vega E.D., Narda G.E. and Ferretti F.H. 2003. Adsorption of citric acid from dilute aqueous solutions by hydroxyapatite. *J Colloid Interface Sci.*, **268**(1):37-42.
361. Jiang W., Pan H., Cai Y., Tao J., Liu P., Xu X. and Tang R. 2008. Atomic force microscopy reveals hydroxyapatite-citrate interfacial structure at the atomic level. *Langmuir*, **24**(21): 12446-12451.
362. Cifuentes I., González-Díaz P. F., Cifuentes-Delatte L. 1980. Is there a “citrate-apatite” in biological calcified systems? *Calcified Tissue International*, **31**(1):147-151.
363. Chavassieux, P. Seeman E., and Delmas P. D. 2007. Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocrine Reviews* **28**(2):151–164.
364. Misra D.N. 1993. Adsorption of low-molecular-weight sodium polyacrylate on hydroxyapatite. *J Dent Res.* **72**(10):1418-1422.
365. Hafez I.T., Paraskeva C.A., Klepetsanis P.G. and Koutsoukos P.G. 2010. Study of polyacrylic acid adsorption on the uninterface of hydroxyapatite – electrolyte solutions. *Global NEST Journal*, **12**:270-278.

366. Skinner J.C., Prosser H.J., Scott R.P. and Wilson A.D. 1986. Adhesion of carboxylate cements to hydroxyapatite. I. The effect of the structure of aliphatic carboxylates on their uptake by hydroxyapatite. *Biomaterials*, **7**(6):438-440.
367. Ellis J., Jackson, A.M. Scott B.P. and Wilson A.D. 1990. Adhesion of carboxylate cements to hydroxyapatite: III. Adsorption of poly(alkenoic acids). *Biomaterials* **11**(6): 379-384.
368. Coutinho E., van Landuit K., De Munck J., Poitevin A., Yoshida Y., Peumans M., Lambrechts P., and van Meerbeek B. 2005. Influence of chemical bonding potential on the adhesiveness of glass-ionomers. *The Joint Meeting of the Continental European (CED) and Scandinavian (NOF) Divisions of the IADR (September 14 – September 17, 2005)*.
369. Van Meerbeek B., De Munck J., Yoshida Y., Inoue S., Vargas M., Vijay P., Van Landuyt K., Lambrechts P. and Vanherle G. 2003. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Buonocore Memorial Lecture. *Operative Dentistry* **28**(3): 215-235.
370. Van Landuyt K. L., Snauwaert J, De Munck J., Peumans M., Yoshida Y., Poitevin A., Coutinho E., Suzuki K., Lambrechts P. and Van Meerbeek B. 2007. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* **28**: 3757–3785.
371. Tyas M.J. and Burrow M.F. 2004. Adhesive restorative materials: A review. *Australian Dental Journal* **49**(3):112-121.
372. Burrow M. 2010. Understanding adhesive dentistry. *Ann Roy Australas Coll Dent Surg* **20**:75-78.
373. Iwasa M., Tsubota K., Shimamura Y., Ando S., Miyazaki M. and Platt J.A. 2011. pH changes upon mixing of single-step self-etching adhesives with powdered dentin. *J Adhes Dent* **13**: 207-212.
374. Yoshida Y., Van Meerbeek B., Nakayama Y., Snauwaert J., Hellemans L., Lambrechts P., Vanherle G. and Wakasa K. 2000. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res* **79**:709-714.
375. Fukuda R., Yoshida Y., Nakayama Y., Okazaki M., Inoue S., Sano H., Suzuki K, Shintani H. and Van Meerbeek B. 2003. Bonding efficacy of polyalkenoic acids to hydroxyapatite, enamel and dentin. *Biomaterials* **24**:1861-1867.
376. Bigi A., Boanini E., Gazzano M., Kojdecki M. A. and Rubini K. 2004. Microstructural investigation of hydroxyapatite-polyelectrolyte composites. *J. Mater. Chem.*, **14**:274-279
377. Bertoni E., Bigi A., Falini G., Panzavolta S. and Roveri N. 1999. Hydroxyapatite/polyacrylic acid nanocrystals. *J. Mater. Chem.*, **9**(3):779-782.
378. Neuman M.W., Neuman W.F. and Burton F.G. 1969. On the possible role of crystals in the origins of life. II. The adsorption of amino acids by apatite crystals. *Currents in Modern Biology* **3**:69-73.
379. Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey Ch. and Lebugle A. 2001. Adsorption of *D*-phospho-*L*-serine and *L*-serine onto poorly crystalline apatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, **238**(1):48-53.
380. Matsumoto T., Okazaki M., Inoue M., Hamada Y., Taira M. and Takahashi J. 2002. Crystallinity and Solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid. *Biomaterials*, **23**:2241–2247.
381. M.H., Matsumoto T., Ishihara S. Nakahira A., Okazaki M. and Sohmura T. 2010. Apatite containing Aspartic acid for selective protein loading. *JDR*, **89**(5):488-492.
382. Boanini E., Fini M., Gazzano M., and Bigi A. Hydroxyapatite nanocrystals modified with acidic amino acids. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2006**(23):4821-4826.
384. Bigi A., Boanini E., Gazzano M. and Rubini K. 2005. Structural and morphological modifications of hydroxyapatite-polyaspartate composite crystals induced by heat treatment. *Crystal Research and Technology*, **40**(10-11):1094-1098.
385. Johnsson M., Levine M.J. and Nancollas G.H. 1993. Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **4**(3/4):371-378.
386. Makrodimitris K., Masica D., Kim E.T. and Gray J.J. 2007. Structure prediction of protein-solid Surface interactions reveals a molecular recognition motif of statherin for hydroxyapatite. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**:13713-13722.
387. Moreno E.C., Kresak M. and Hay D.I. 1984. Absorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int.* **36**(1):48-59.
388. Wiliei K., Burke E.M., Perich J.W., Reynolds E.C. and Nancollas G.H. 1994. Hydroxyapatite Mineralization and demineralization in the presence of synthetic phosphorylated pentapeptides. *Arch Oral Biol.* **39**(8):715- 721.
389. Raj P.A., Honsson M., Levine M.J. and Nancollas G.H. 1992. Salivary statherin. Dependence of sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. *J. Biol. Chem.* **267**:5968-5976.

390. Douglas W.H., Reeh E.S., Ramasubbu N., Raj P.A., Bhandary K.K. and Levine M.J. 1991. Statherin: a major boundary lubricant of human saliva. *Biochem Biophys Res Commun.* **180**(1):91-97.
391. Johnsson M., Richardson C.F., Bergey E.J., Levine M.J. and Nancollas G.H. 1991. The effects of human salivary cystatins and statherin on hydroxyapatite crystallization. *Archives of Oral Biology*, **36**(9): 631-636.
392. Goobes R., Goobes G., Campbell Ch.T., and Stayton P.S. 2006. Thermodynamics of statherin absorption onto hydroxyapatite. *Biochemistry*, **45**:5576-5586.
393. Goobes R., Goobes G., Shaw W.J., Drobny G.P., Campbell C.T. and Stayton P.S. 2007. Thermodynamic roles of basic amino acids in statherin recognition of hydroxyapatite. *Biochemistry*. **46**(16):4725-4733.
394. Ndao M, Ash JT, Stayton PS, Drobny GP. 2010. The role of basic amino acids in the molecular recognition of hydroxyapatite by statherin using solid state NMR. *Surf Sci.* **604**(15-16):L39-L42.
395. Long J.R., Dindot J.L., Zebroski H., Kiihne S., Clark R.H., Campbell A.A., Stayton P.S. and Drobny G.P. 1998. A peptide that inhibits hydroxyapatite growth is in an extended conformation on the crystal surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:12083-12087.
396. Long J.R., Shaw W.J., Stayton P.S. and Drobny G.P. 2001. Structure and dynamics of hydrated statherin on hydroxyapatite as determined by solid-state NMR. *Biochemistry*, **40**(51):15451-15455.
397. Gibson J.M., Raghunathan V., Popham J.M., Stayton P. and Drobny G.P. 2005. A REDOR NMR Study of a Phosphorylated Statherin Fragment Bound to Hydroxyapatite Crystals. *Journal of the American Chemical Society*, **127**(26):9350-9351.
398. Stayton P.S., Drobny G.P., Shaw W.J. Long J.R. and Gilbert M. 2003. Molecular recognition at the protein- hydroxyapatite interface. *CROBM* **14**(5): 370-376.
399. Goobes G., Goobes R., Schueler-Furman O., Baker D., Stayton P. S. and Drobny G. P. Folding of the C- terminal bacterial binding domain in statherin upon adsorption onto hydroxyapatite crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(44):16083-16088.
400. Ndao M, Ash JT, Breen NF, Goobes G, Stayton PS, Drobny GP. 2009. A $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ REDOR NMR investigation of the role of glutamic acid residues in statherin-hydroxyapatite recognition. *Langmuir*. **25**(20):12136-12143.
401. Fukada H. and Takahashi K. 1998. Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **33**:159-166.
402. Kellar J.J., Cross W.M., Yalamanchili M.R., Young C.A. and Miller J.D. 1993. Surface phase transitions of adsorbed collector molecules as revealed by in situ FT-IR/IRS spectroscopy. *Minerals and Metallurgical Processing* **10**(2):75-80.
403. King D.A. and Woodruff (eds) 1994. *The Chemical Physics of Solid Surfaces*. Volume 7. *Phase Transformations and Adsorbate Restructuring at Metal Surfaces*. Elsevier Science B.V.
404. Tanizawa Y, Johna N, Yamamoto Y, Nishikawa N. 2004. Salivary films on hydroxyapatite studied by an in vitro system for investigating the effect of metal ions and by a quartz-crystal microbalance system for monitoring layer-by-layer film formation. *J Cosmet Sci.* **55**(2):163-176.
405. Siqueira W.L., Bakkal M., Xiao Y., Sutton J.N. and Mendes F.M. 2012. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS ONE* **7**(8): e42204. doi:10.1371/journal.pone.0042204
406. Uskoković V., Kim M.-K., Li W. and Habelitz S. 2008. Enzymatic processing of amelogenin During continuous crystallization of apatite. *J Mater Res.* **23**(12): 3184-3195.
407. Margolis H.C., Beniash E. and Fowler C.E. 2006. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res.* **85**(9):775-93.
408. Fincham A.G. and Moradian-Oldak J. 1995. Recent advances in amelogenin biochemistry. *Connect Tissue Res* **32**(1-4):119-124.
409. Wang, L. Guan X., Yin H., Moradian-Oldak J. and Nancollas G.H. 2008. Mimicking the self-organized microstructure of tooth enamel. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, **112**(15):5892-5899.
410. Hauschka P. V. and Reid M.L. 1989. Timed appearance of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in developing chick bone. *Developmental Biology*, **65**(2): 426-434.
411. Torres R., de la Piedra C. and Rapado A. 1991. Binding of serum osteocalcin to hydroxyapatite in Paget's disease of bone. *Bone and Mineral*, **14**(1):55-65.

412. Hauschka P.V. and Wians F. H. Jr. 1989. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical Record*, **224**(2):180–188.
413. Embery G., Milner A.C., Waddington R.J., Hall R.C., Langley M.S. and Milan A.M. 2003. Identification of proteinaceous material in the bone of the dinosaur *Iguanodon*. *Connect Tissue Res.* **44** (Suppl 1):41-46.
414. Collins M.J., Gernaey A.M., Nielsen-Marsh C.M., C. Vermeer C. and P. Westbroek P. 2000. Slow rates of degradation of osteocalcin: Green light for fossil bone protein? *Geology*, **28**:1139-1142.
415. Atkinson R.A., Evans J.S., Hauschka P.V., Levine B.A., Meats R., Triffitt J.T., Viridi A.S. and Williams R.J. 1995. Conformational studies of osteocalcin in solution. *Eur J Biochem.* **232**(2):515-521.
416. Mizuguchi M, Fujisawa R, Nara M, Nitta K, Kawano K. 2001. Fourier-transform infrared spectroscopic study of Ca²⁺-binding to osteocalcin. *Calcif Tissue Int.* **69**(6):337-342.
417. Hoang Q.Q., Sicheri F., Howard A.J. and Yang DS. 2003. Bone recognition mechanism of porcine Osteocalcin from crystal structure. *Nature.* **425**(6961):977-80.
418. Yin G., Liu Zh., Zhan J., Ding F. and Yuan N. 2002. Impacts of the surface charge property on Protein adsorption on hydroxyapatite. *Chemical Engineering Journal* **87**:181-186.
419. Wassell DT, Hall RC, Embery G. 1995. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials* **16**(9):697-702.
420. Kandori K., Masunari A. and Ishikawa T. 2005. Study on adsorption mechanism of proteins onto Synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcified Tissue International* **76**(3):194 -206.
421. Kandori K, Oda S and Tsuyama S. 2008. Effects of pyrophosphate ions on protein adsorption onto calcium hydroxyapatite. *The journal of physical chemistry B* **112**(8):2542-2547.
422. Fears K. 2012. Adsorption Behavior of Serum Albumin on Nanocrystalline Apatites. *AVS 59th Annual International Symposium and Exhibition. Biomaterial Interfaces.*
423. Kandori K., Toshima S., Wakamura M., Fukusumi M. and Morisada Y. 2010. Effects of modification of calcium hydroxyapatites by trivalent metal ions on the protein adsorption behavior. *The Journal of Physical Chemistry, B* **114**: 2399-2404.
424. Mavropoulos E, Kede M. L. F. M., da Rocha N. C. C., Machado Costa A., Tosi A, Prado da Silva M. H. and Ross A. M. 2011. BSA attachment on apatite surface modified with Zn²⁺ and Sr²⁺. *Bioceramics Development and Applications* Vol. 1 (2011), Article ID D101115, 3 pages.
425. Kandori K., Oketani M. and Wakamura M. 2007. Effects of Ti(IV) substitution on protein Adsorption behaviors of calcium hydroxyapatite particles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **58**(2):98-104.
426. Kandori K., Kuroda T. and Wakamura M. 2011. Protein adsorption behaviors onto photocatalytic Ti(IV)-doped calcium hydroxyapatite particles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **87**(2):472-479.
427. Mavropoulos E., da Rocha N. C.C, Rocha-Leão M. H. M., Rossi A. M. 2007. BSA adsorption on hydroxyapatite after thermal treatment. *Key Engineering Materials*, **361-363**:127-130.
428. Kawachi G., Watanabe T., Ogata Sh., Kamikatahara M. and Ohsuki Ch. Protein adsorption on needle-shaped hydroxyapatite prepared by hydrothermal treatment of mixture composed of CaHPO₄·2H₂O and β-Ca₃(PO₄)₂. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 117(**1367**):847-850.
429. Dasgupta S., Banerjee Sh.S., A. and Bose S. 2010. Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein. *Langmuir*, **26**(7):4958-4964.
430. Meyer J. L., McCall J.T. and Smith L.H. 1974. Inhibition of calcium phosphate crystallization by nucleoside phosphates. *Calcified Tissue Research*, **15**(1):287-293.
431. Termine J.D. and Conn K.M. 1976. Inhibition of apatite formation by phosphorylated metabolites and macromolecules. *Calcif Tissue Res.* **22**(2):149-57.
432. Christoffersen M. R. and Christoffersen J. 1984. The inhibitory effects of ATP, ADP, and AMP on the rate of dissolution of calcium hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int.*, **36**:659-661.
433. Winter D. and Zubay G. 1995. Binding of adenine and adenine-related compounds to the clay montmorillonite and the mineral hydroxyapatite. *Origins of Life and Evolution of Biosphere*, **25**:61-81.
434. Tesis A.C. and Vieyra A. 1996. Divalent cations modify adsorption of 5'-AMP onto precipitated calcium phosphate: A model for cation modulation of adsorptive process in primitive aqueous environments. *J. Mol. Evol.*, **43**:425-430.
435. 435. Козлова О.Г. 1967. *Рост кристаллов*. Издательство МГУ.

436. Tesis A.C., de Amorim H.S., Farina M., de Souza-Barros F. and Vieyra A. 1995. Adsorption of 5'-AMP and catalytic synthesis of 5'-ADP onto phosphate surfaces: correlation to solid matrix structures. *Origins of Life and Evolution of Biosphere*, **25**:351-373
437. Andreas-Pfannkoch C., Fadrosch D.W., Thorpe J. and Williamson J. 2010. Hydroxyapatite-mediated Separation of double-stranded DNA, single-stranded DNA, and RNA genomes from natural viral assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**(15):5039-5045.
438. Ng P., He J., and Cohen A., 2006. Bio-Rad Laboratories, *How CHT Ceramic Hydroxyapatite Works*. Inc., Hercules, CA 94547 USA.
439. Ng P. K., Gagnon P. and Aberin C., 2000. *Differential Retention of DNA on Ceramic Hydroxyapatite (CHT) and Ceramic Fluoroapatite (CFT)*. Bio-Rad Laboratories Incorporated Research and Development Department, Process Applications.
440. Obi F.O. 1986. Interaction of DNA with hydroxyapatite. Studies on the effect of the phosphate concentration of the column equilibration and washing buffer. *Journal of Chromatography*, **369**:321-326.
441. Steinschneider A. 1975. Thermal chromatography of lysine-specific transfer ribonucleic acid from *Escherichia coli* B. *Journal of Chromatography*, **103**:355-363.
442. Gagnon P. Winter 2010/2011. Dissociation of antibody–contaminant complexes with hydroxyapatite. *Trends and Developments in Bioprocess Technology*, **9**(2):14-24.
443. Gagnon P. 2008. Phosphate-free buffer systems: A new frontier for apatite chromatography. *4th International Conference on Hydroxyapatite*, Sonoma, May 2-6, 2008.
444. Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D. and Thomas P. 2002. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials* **23**:1065-1072.
445. Martinson H.J. 1973. The nucleic acid – hydroxyapatite interaction. II. Phase transition in the deoxyribonucleic acid - hydroxyapatite system. *Biochemistry*, **12**(1):145
446. Martinson H.J. 1973. The nucleic acid – hydroxyapatite interaction. I. Stabilization of native double-stranded deoxyribonucleic acid by hydroxyapatite. *Biochemistry*, **12**(1):139-145.
447. Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E., Petersen B., Moltke I., Johnson P. L.F., Fumagalli M., Vilstrup J. T., Raghavan M., Korneliusen T., Malaspina A.-S., Vogt J., Szklarczyk D., Kelstrup C. D., Vinther J., Dolocan A., Stenderup J., Velazquez A. M. V., Cahill J., Rasmussen M. et al. 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, **499**:74-78.
448. Donoghue H.D., Spigelman M., Zias J., Gernaey-Child A.M. and Minnikin D.E. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology*, **27**, 265-269.
449. Duer M.J., Friscic T., Proudfoot D., Reid D.G., Schoppet M., Shanaham C.M., Skepper J.N. and Wise E.R. 2008. Mineral surface in calcified plaque is like that of bone: Further evidence for regulated mineralization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **28**:2030-2034.
450. Götherström A., Collins M. J., Angerbjörn A. and Lidén K. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, **44**:395–404.
451. Brundin M., Figdor D., Sundqvist G., Sjögren U. 2013. DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA. *Journal of endodontics*, **39**(2):211-216.
452. Graham, F. L. & Van Der EB, A. J. 1973. New technique for assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, **52**(2):456-467.
453. Ngoun S.C., Butts H.A., Petty A.R., Anderson J.E. and Gerdon A.E. 2012. Quartz crystal microbalance analysis of DNA-templated calcium phosphate mineralization. *Langmuir*, **28**(33):12151–12158.
454. Jordan M., Schallhorn A. and Wurm F.M. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research*, **24**(4):596–601.
455. Wu G.-J., Zhou L.-Z., Wang K.-W., Chen F., Sun Y., Duan Y. -R., Zhu Y.-J. and Gu H.-Ch. 2010. Hydroxylapatite nanorods: An efficient and promising carrier for gene transfection. *Journal of Colloid and Interface Science*, **345**:427-432.
456. Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M. 2006. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, **27**(16):3147-3153.
457. Okazaki M., Yoshida Y., Yamaguchi S., Kaneno M. and Elliott J.C. 2001. Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials*, **22**:2459-2464.

458. Kostetsky E.Y. 1999. On the origin of life and the possibility of the development of protocells and their structural elements in apatite crystals. *J Evol Biochim Physiol*, **35**:249-256.
459. Barroug A., Lernoux E., Lemaitre J., Rouxhet P.G. 1998. Adsorption of catalase on hydroxyapatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, **208**(1): 147-152.
460. Barciszewski J., Jurczak J., Porowski S., Specht Th. and Erdmann V.A. 1999. The role of water structure in conformational changes of nucleic acids in ambient and high-pressure conditions. *Eur. J. Biochem.*, **260**:293-307.
461. Williams L.D., Egli M., Gao Q. and Rich A. 1992. DNA intercalation: helix unwinding and neighbor- exclusion. *Structure & Function, Volume I: Nucleic Acids*. Sarma R.H. and Sama M.H. Eds. Adenine Press.
462. Jursa J. and Kypr J. 1993. Geometries and energies of Watson-Crick base pairs in oligonucleotide crystal structures. *Gen. Physiol. Biophys.*, **12**:401-419.
463. Klump H.H., Schmid E. and Wosgien M. 1993. Energetics of Z-DNA formation in poly d(A-T), poly d(G-C), and poly d(A-C) poly d(G-T). *Nucleic Acids Research*, **21**(10):2343-2348.
464. Berman H.M. 1994. Hydration of DNA: take 2. *Current Opinion in Structural Biology*, **4**:345-350.
465. Macgregor R.B., Jr. 1998. Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. *Biopolymers*, **48**(4):253-263.
467. [U9] Perkins Th. T., Smith D. E., Larson R.G. and Chu S. 1995. Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science*, **268**(5207):83-87.
468. Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D. 1994. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 265(5181):2096-2098.
469. Preisler R.S., Chen H.H., Colombo M.F., Choe Y., Short B.J., Jr. and Rau D.C. 1995. The B form to Z form transition of poly(dG-m⁵dC) is sensitive to neutral solutes through an osmotic stress. *Biochemistry*, **34**:14400-14407.
470. Cochain A.G. 1968. The crystal chemistry of apatites. *Mineralogical Magazine*, **36**:654-660.
471. Elliott, J.C. 1994. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier: Amsterdam.
472. Kazin P.E., Gazizova O.R., Karpov A.S., Jansen M. and Tretyakov Y.D. 2007. Incorporation of 3d-metal ions in the hexagonal channels of the Sr₅(PO₄)₃OH apatite.
473. Baikie T., Ng G.M. H., Madhavi S., Pramana S. S., Blake K., Elcombe M. and Whitea T.J. 2009. The crystal chemistry of the alkaline-earth apatites A₁₀(PO₄)₆Cu_xO_y(H)_z (A = Ca, Sr and Ba). *Dalton Trans.*, 2009, 6722- 6726.
474. Kim J.Y., Fenton R.R., Hunter B.A. and Kennedy B.J. 2000. Powder diffraction studies of synthetic calcium and lead apatites. *Australian Journal of Chemistry*, **53**(8):679-686.
475. McCubbin F.M., Mason H.E., Park H., Phillips B.L., Parise J.B., Nakvasil H. and Lindsley D.H. 2008. Synthesis and characterization of low-OH⁻ fluor-chlorapatite: A single-crystal XRD and NMR spectroscopic study. *American Mineralogist*, **93**:210-216.
476. Elliott J.C., Dykes E. and Mackie P.E. 1981. Structure of bromapatite and the radius of the bromide ion. *Acta Cryst.* **B37**, 435-438.
477. White T.J. and ZhiLi D. 2003. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. *Acta Crystallographica*, **B59**:1-16.
478. Kreidler E.R. and Hummel F.A. 1970. The crystal chemistry of apatite: Structure fields of fluor- and chlorapatite. *The American Mineralogist*, **55**:170-183.
479. Nsar S., Ben Salem E. and Bouzouita Kh. 2012. Dilatometric studies on magnesium and fluorine-co-substituted hydroxyapatite. *Journal de la Société Chimique Tunisie*, 14:191-200.
480. Grisafe D. A. and Hummel F. A. 1970. Crystal chemistry and color in apatites containing cobalt, nickel, and rare-earth ions. *The American Mineralogist*, **55**:1131-1145.
481. Minguzzi C. 1941. Apatiti sintetiche con cromo trivalente ed esavalente. *Periodico Miner. Anno* 12(3): 343-378.
482. Li J.-L. 2009. *Structural Characterization of Apatite-Like Materials*. A thesis submitted to the School of Metallurgy and Materials for the degree of MRes in Biomaterials. University of Birmingham, Birmingham.

483. Baikie T., Ng G.M. H., Madhavi S., Pramana S. S., Blake K., Elcombe M. and Whitea T.J. 2009. The crystal chemistry of the alkaline-earth apatites $A_{10}(PO_4)_6Cu_xO_y(H)_z$ (A = Ca, Sr and Ba). *Dalton Trans.*, 2009, 6722- 6726.
484. Jaffe E.B. 1951. Abstracts of the literature on the synthesis of apatites and some related phosphates. *Geological Survey Circular* 135, United States Department of the Interior, Geological Survey, Washington D.C.
485. Lij Y. and Comodi P. 1993. Some aspects of the crystal-chemistry of apatites. *Mineralogical Magazine*, **57**:709-719.
486. Ivanova T. I., Frank-Kamenetskaya O. V., Kol' tsov A. B., and Ugolkov V. L. 2001. Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal Decomposition. *Journal of Solid State Chemistry*, **160**:340-349.
487. Ito J. 1968. Silicate apatites and oxyapatites. *The American Mineralogist*, **53**:890-907.
488. Hughes J.M., Cameron M. and Crowley K.D. 1990. Crystal structures of ternary apatites: Solid solution in the $Ca_5(PO_4)_3X$ (X = F, OH, Cl) system. *The American Mineralogist*, **75**:295-304.
489. DeBoer B.G. 1991. Determination of the antimony substitution site in calcium fluorapatite from powder X-ray diffraction data. *Acta Cryst.* **B47**:683-692.
490. Klement R. and H. Haselbeck. 1965. Apatite and Wagnerite zweiwertiger Metalle. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **336**:113-128.
491. Low H.R., Phonthammachai N., Maignan A., Stewart G.A., Bastow T.J., Ma L.L. and White T. J. 2008. The crystal chemistry of ferric oxyhydroxyapatite. *Inorg. Chem.*, **47**(24):1774-1782.
492. Adolfsson E. and Hermansson L. 2000. Phase stability aspects of various apatite-aluminium oxide composites. *Journal of Material Science*, **35**(22):5719-5723.
493. Nriagu J.O. 1976. Phosphate – clay mineral relations in soils and sediments. *Canadian Journal of Earth Sciences*, **13**(6):717-736.
494. Vielard P. and Tardy Y. 1984. Thermochemical properties of phosphates. In Nriagu J.O., Moore P.B., editors. *Phosphate Minerals*. Berlin:Springer-Verlag, pp. 171-198.
495. Nriagu J.O. 1984. Formation and stability of base metal phosphates in soils and sediments. In: Nriagu J.O., Moore P.B., editors. *Phosphate Minerals*. Berlin:Springer-Verlag, pp. 318-329.
496. Miyaji F., Kono Y., and Suyama Y. 2005. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Materials Research Bulletin*, **40**:209-220.
497. Bigi A., Foresti E., Gandolfi M., Gazzano M. and Roveri N. 1995. Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **58**:49-58.
498. Li M. O., Xiao X., Liu R., Chen C. and Huang L. 2008. Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **19**:797-803.
499. Silva C.G.W., Hemmers O., Czerwinski K. R. and Lindle D.W. 2008. Investigation of nanostructure and thermal behavior of zinc-substituted fluorapatite. *Inorganic Chemistry*, **47**:7757-7767.
500. Pujari M. and Patel P.M. 1989. Strontium-copper-calcium hydroxyapatite solid solutions: Preparation, infrared, and lattice constant measurements. *Journal of Solid State Chemistry*, **83**(1):100-104.
501. Prener J.S. 1967. The growth and crystallographic properties of calcium fluor- and chlorapatite crystals. *J. Electrochem. Soc.* **114**(1):77-83.
502. Klemme S., John T., Wessels M., Kusebauch Ch., Berndt J., Rohrbach A. and Schmid-Beurmann P. 2013. Synthesis of trace element bearing single crystals of Chlor-Apatite ($Ca_5(PO_4)_3Cl$) using the flux growth method. *Chemistry Central Journal*, **7**(1):56-62.
503. García-Tuñón E., Couceiro R., Franco J., Saiz E. 2012. Synthesis and characterisation of large chlorapatite single-crystals with controlled morphology and surface roughness. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **23**(10):2471-2482.
504. Ooi S., Suzuki T. and Oishi S. 2002. Effect of cooling rate on flux growth of chlorapatite crystals. *Journal of the Japanese Association of Crystal Growth*, **29**(2):111.
505. Teshima K., Yubuta K., Ooi S., Suzuki T., Shishido T., and Oishi S. 2006. Environmentally friendly growth of calcium chlorapatite whiskers from a sodium chloride flux. *Crystal Growth & Design*, **6**(11): 2538-2542.
506. Oishi S. and Sugiura I. 1997. Growth of chlorapatite crystals from a sodium chloride flux. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **70**(10):2483-2487.
507. Dykes E. 1974. Preparation and characterisation of calcium bromapatite. *Materials Research Bulletin*, **9**(9):1227-1236.

508. Prener J.S. 1971. Nonstoichiometry in calcium chlorapatite. *Journal of Solid State Chemistry*, **3**(1):49-55.
509. Baumer A. and Argiolas R. 1981. Hydrothermal synthesis and characterization by X-ray of chlor, fluor or hydroxyapatite crystals. *N Jahrb Mineralogie-Monatsh*, **8**:344- 348.
510. Roufosse A., Harvill M.L., Gilliam O.R. and Kostiner E. 1973. The hydrothermal crystal growth of chlorapatite. *Journal of Crystal Growth*, **19**(3):211-212.
511. Hills Ch., Dodson G., Heinemann U., Saenger W., Mitsui Yu., Nakamura K, Borisov S., Tischenko G., Polyakov K. and Pavlovsky S. 1983. The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends in Biochemical Sciences*, **8**(10):364-369.
512. Loverix S. 2000. *Analysis of the Transphosphorylation Reaction Catalyzed by RNase T1 via Site-directed Mutagenesis and Chemically Modified Substrates*. Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de wettelijke graad van Doctor in de Toegepaste Biologische Wetenschappen.
513. Raines R.T. 2004. Active site of ribonuclease A. In: *Nucleic Acids and Molecular Biology*, **13**: 19-32. Marina A. Zenkova (Ed.) *Artificial Nucleases*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
514. Engel G., Pretzsch J., Gramlich V. and Baur W.H. 1975. The crystal structure of hydrothermally grown manganese chlorapatite, $Mn_5(PO_4)_3Cl_{0.9}(OH)_{0.1}$. *Acta Crystallographica* **B31**(7):1854-1860.
515. Verwilghen C., Rio S., Ramarozon J., Nzihou A. and Sharrock P. 2007. The use of hydroxyapatite for the removal of heavy metals from industrial flue gas - Investigation at pilot scale. *DustConf.*, Tuesday, April 24th 2007.
516. Wodak Sh.Y., Liu M.Y. and Wyckoff H.W. 1977. The structure of cytidilyl(2',5')adenosine when bound to pancreatic ribonuclease S. *J. Mol. Biol.*, **116**:855-875.
517. Gho S. and Zhang J. 2006. Ancient expansion of the ribonuclease A superfamily revealed by genomic analysis of placental and marsupial mammals. *Gene*, **373**:116-125.
518. Allen K. and Dunaway-Mariano D. 2004. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **29**(9):495-503.
519. Fedor M.J. and Williamson J.R. 2005. The catalytic diversity of RNAs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **6**:399-412.
520. Strobel S.A. and Cochrane J.S. 2007. RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches. *Current Opinion in Chemical Biology*, **11**:636-643.
521. Raines R.T. 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.*, **98**:1045-1065.
522. Breslow R. and Chapman W. H. Jr. 1996. On the mechanism of action of ribonuclease A: Relevance of enzymatic studies with a *p*-nitrophenylphosphate ester and a thiophosphate ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. Chemistry*, **93**:10018-10021.
523. Loverix S., Winqvist A., Strömberg R. and Steyaert J. 2000. Mechanism of RNase T1: concerted trimeric-like phosphoryl transfer via a catalytic three-centered hydrogen bond. *Chemistr & Biology*, **7**:651-658.
524. Doumen J., Gonciars M., Zegers I., Loris R. Wyns L. and Steaert J. 1996. A catalytic function for the structurally conserved residue Phe 100 of ribonuclease T₁. *Protein Science*, **5**:1523-1530
525. Müller S., Appel B., Krellenberg T. and Petkovic S. 2012. The many faces of the hairpin ribozyme: Structural and functional variants of a small catalytic RNA. *IUBMB Life*, **64**(1):36-47.
526. Rupert P.B. and Ferré-D'Amaré A.R. 2001. Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, **410**:780-786.
527. Rupert P.B., Massey A.P., Sigurdsson S.Th. and Ferré-D'Amaré A.R. 2002. Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science*, **298**:1421-1424.
528. Ferré-D'Amaré A.R. and Scott W.G. 2010. Small self-cleaving ribozymes. *Cold Spring Harb erspect Biol*, **2**:a003574.
529. Cowan J.A. 1993. Metallochemistry of RNA. $Co(NH_3)_6^{3+}$ as a probe for $Mg^{2+}(aq)$ binding sites. *J Inorg Biochem.*, **49**(3)171-175.
530. Young K.J., Gill F. and Grasby J.A. 1997. Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalyzed reaction. *Nucleic Acids Research*, **25**(19):3760-3766.
531. Lebruska L.L., Kusmine I.I. and Fedor M.J. 2002. Rescue of an abasic hairpin ribozyme by cationic nucleobases: Evidence for a novel mechanism of RNA catalysis. *Chemistry & Biology*, **9**:465-473.
532. Kuzmin Y.I., Da Costa C.P., Cottrell J.W. and Fedor M.J. 2005. Role of an active site adenine in hairpin ribozyme catalysis. *J. Mol. Biol.* **349**:989-1010.
533. Perroatta A.T., Shih I-h. and Been M.D. 1999. Imidazole rescue of a cytosine mutation in a self-cleaving ribozyme. *Science* **286**:123-126.
534. Shih I-h. and Been M.D. 2001. Involvement of a cytosine side chain in proton transfer in the rate-

- determining step of ribozyme self-cleavage. *PNAS* **98**(4):1489-1494.
535. Peracchi A., Matulic-Adamic J., Wang S., Beigelman L. and Herschlag D. 1998. Structure function relationships in the hammerhead ribozyme probed by base rescue. *RNA*, **4**(11):1332-1346.
536. Smidansky E.D., Arnold J.J. and Cameron C.E. 2008. Nucleic acid polymerase fidelity and viral population fitness. Ch. IV in *Origin and Evolution of Viruses. Second Edition*. Domingo E., Parrish C.R. and Holland J.J.(eds). Academic Press, Elsevier.
537. Paleotti J. Baziote D., Morvan F., Imbach J.-L. and Paoletti C. 1989. α -DNA VIII: thermodynamic parameters of complexes formed between the oligo-alpha-deoxynucleotides: α -d(GGAAGG) and α -d(CCTTCC) and their complementary oligo-beta-deoxynucleotides: β -d(CCTTCC) and β -d(GGAAGG) are different. *Nucleic Acids Research* **17**(7):2693-2704.
538. Cramer P., Bushnell D.A. and Kornberg R.D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*, **292**:1863-1876.
539. Armache K.J., Kettenberger H. and Cramer P. 2005. The dynamic machinery of mRNA elongation. *Current Opinion in Structural Biology*, **15**:197-203.
540. Vicens Q. and Cech Th.R. 2006. Atomic level architecture of group I introns revealed. *Trends in Biochemical Sciences*, **31**(1):41-51.
541. Stahley M.R. and Strobel S.A. 2006. RNA splicing: group I introns crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, **16**:319-326.
542. Marcia M. and Pyle A.M. 2012. Visualizing group II intron catalysis through the stages of splicing. *Cell*, **151**(3):497-507.
543. Marcia M. Somarowthu S. and Pyle A.M. 2013. Now on display: a gallery of group II intron structures at different stages of catalysis. *Mobile DNA*, **4**:1-14.
544. Sreedhara A. and Cowan J.A. 2001. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J Biol Inorg Chem*, **6**:337-347.
545. Mitić N., Smith S.J., Neves A., Guddat L.W., Gahan L.R. and Schenk G. 2006. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.*, **106**:3338-3363.
546. Schenk G., Mitić N., Gahan L.R., Ollis D.L., McGeary R.P. and Guddat L.W. 2012. Binuclear metallohydrolases: complex mechanistic strategies for a simple chemical reaction. *Accounts of Chemical Research*, **45**(9):1593-1603.
547. Stäter N., Lipcomb W.N., Klabunde Th. and Krebs B. 1996. Two-metal ion catalysis in enzymatic acyl- and phosphoryl-transfer reactions. *Angew. Chem. Im.Ed. Engl.*, **35**:2024-2025.
548. Wöckel S. 2011. *Synthetic Models for Divalent Metallohydrolases*. Dissertation zur Erlangung des mathematisch- naturwissenschaftlichen Doctorgrades "Doctor rerum naturalium" der Georg-August-Universität Göttingen.
549. Volbeda A., Lahm A., Sakiyama F. and Suck D. 1991. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution. *The EMBO Journal*, **10**(7):1607-1618.
550. Samples C.R., Howard T., Raushedl F.M. and DeRose V.J. 2005. Protonation of the binuclear center within the active site of phosphotriesterase. *Biochemistry*, **44**(33):11005-11013.551.
551. Yang W., Lee J.Y. and Nowotny M. 2006. Making and breaking nucleic acids: two-Mg²⁺-ion catalysis and substrate specificity. *Molecular Cell*, **22**:5-13.
552. Breslow R. and Labelle M. 1986. Sequential general base-acid catalysis in the hydrolysis of NRA by Imidazole. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**(10):2655-2659.
553. Anslyn E. and Breslow R. 1988. On the mechanism of catalysis of ribonuclease: Cleavage and isomerization of the dinucleotide UpU catalyzed by Imidazole buffers. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**:4473-4482.
554. Beckmann C., Kirby A.J., Kuusela S. and Tickle D.C. 1998. Mechanisms of catalysis by imidazole buffers of the hydrolysis and isomerisation of RNA models. *J. Chem. Soc, Perkin Trans.*, **2**:573-581.
555. Kawamura K. 2003. Kinetics and activation parameter analyses of hydrolysis and interconversion of 2',5'- and 3',5'-linked dinucleoside monophosphate at extremely high temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1620**:199-210.
556. Breslow R., Huang D.-L. and Anslyn E. 1989. On the mechanism of action of ribonucleases: Dinucleotide cleavage catalyzed by imidazole and Zn²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:1746-1750.
557. Vlasov V.V., Zuber G., Felden B., Behr J.-P. and Giegé R. 1995. Cleavage of tRNA with imidazole and spermidine-imidazole constructs: a new approach for probing RNA structure. *Nucleic Acids Research*, **23**(16):3161-3167.
558. Bibillo A., Figlerowicz M. and Kierzek R. 1999. The non-enzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides VI. The role of biogenic polyamides. *Nucleic Acids Research*, **27**(19):3931-

559. Fouace S., Gaudin C., Picard S., Corvaisier S., Renault J., Carboni B. and Felden B. 2004. Polyamine derivatives as selective RNaseA mimics. *Nucleic Acids Research*, **32** (1)151-157.
560. Shinozuka K., Nakashima Y., Shimizu K. and Sawai H. 2001. Synthesis and characterization of polyamine- based biomimetic catalysts as artificial ribonuclease. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **20**(1&2):117-130.
561. Endo M., Hirata K., Ihara T., Sueda Sh., Takagi M. and Komiyama M. 1996. RNA hydrolysis by the cooperation of carboxylate ion and ammonium ion. *J. Am. Chem. Soc.* 118:5478-5479.
562. Kierzek R. 1992. Hydrolysis of oligoribonucleotides: influence of sequence and length. *Nucleic Acids Research*, **20**(19):5073-5077.
563. Biblio A., Figlerowicz M., Ziomek K. and Kierzek R. 2000. The nonenzymatic hydrolysis of oligonucleotides VII. Structural elements affecting hydrolysis. *Nucleotides, Nucleosides & Nucleic Acids*, **19**(5&6):977-994.
564. Kaukinen U., Lyytikäinen S. and Lönnberg H. 2002. The reactivity of phosphodiester bonds within linear single-stranded oligoribonucleotides is strongly dependent on the base sequence. *Nucleic Acids Research*, **30**(2):468-474.
565. Sreedhara A. and Cowan J.A. 2001. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**:337-347.
567. Mancin F., Scrimin P. and Tecilla P. 2012. Progress in artificial metallonucleases. *Chem. Commun.*, **48**:5545:5559.
568. Breslow R. and Huang D.-L. 1991. Effect of metal ions, including Mg²⁺ and lanthanides, on the cleavage of ribonucleotides and RNA model compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:4080:4083.
569. Breslow R., Husng D.-H. and Anslyn E. 1989. On the mechanism of action of ribonucleases: Dinucleoside cleavage catalyzed by imidazole and Zn²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:1746-1750.
570. Komiyama M., Takeda N. and Shigekawa H. 1999. Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: mechanistic studies leading to new applications. *Chem. Commun.*, 1999(16):1443-1451.
571. Komiyama M., Takeda N., Takahashi Y., Uchida H., Shiiba T., Kodama T. and Yashiro M. 1995. Efficient and oxygen-independent hydrolysis of single-stranded DNA by cerium(IV) ion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**:269-274.
572. Sumaoka J., Azuma Ya. and Komiyama M. 1998. Enzymatic manipulation of the fragments obtained by cerium(IV)-induced DNA scission: characterization of hydrolytic termini. *Chemistry – A European Journal*, **4**(2):205-209.
573. Komiyama M., Takeda N., Takahashi Yo., Uchida H., Shiiba T., Kodama T. and Yashiro M. 1995. Efficient and oxygen-independent hydrolysis of single-stranded DNA by cerium(IV) ion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**:269-274.
574. Takeda N., Imai T., Irisawa M., Sumaoka J., Yashiro M, Shigekawa H. and Komiyama M. 1996. Unprecedentedly fast DNA hydrolysis by synergism of the cerium(IV)-Praseodimium(III) and cerium(IV)- neodymium(III) combinations. *Chemistry Letters*, **25**(8):599-600.
575. Mancin F., Scrimin P., Tecilla P. and Tonellato U. 2005. Artificial metallonucleases. *Chem. Commun.*, 2005, 2540-2548.
576. Mancin F., Scrimin P., Tecilla P. 2012. Progress in artificial metallonucleases. *Chem. Commun.*, **48**:5545-5559.
577. Liu Ch., Yu S., Li D., Liao Zh., Sun X. and Xu H. 2002. DNA hydrolytic cleavage by the diiron(III) complex Fe₂(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)CIBF₄)₂: Comparison with other binuclear transition metal complexes. *Inorg. Chem.*, **41**:913-922.
578. Кришталік Л.І. 2012. Белки как специфическая полярная среда процессов переноса заряда. *Успехи Физических Наук*, **182**(12):1275-1300.
579. Mertz E.L. and Krishtalik L.I. 2000. Low dielectric response in enzyme active site. *PNAS*, **29**(5):2081-2086.
580. Liu T. 2011. *Efficient Metal-Promoted Biomimetic Catalysis of Phosphoryl Transfer Reactions in Alcohols*. A thesis submitted to the Department of Chemistry, Queen's University in conformity with the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.
581. Sanches-Lombardo I. and Yatsimirsky A.K. 2008. Simplified speciation and improved phosphodiesterolytic activity of hydroxo complexes of trivalent lanthanides in aqueous DMSO. *Inorganic Chemistry*, **47**:2514-2525.

582. Corona-Martinez D.O., Taran O. and Yatsimirsk A.K. 2010. Mechanism of general acid-base catalysis in transesterification of an RNA model phosphodiester studied with strongly basic catalysts. *Org. Biol. Chem.*, **8**:873-880.
583. Serra M.J. and Turner D.H. 1995. Predicting thermodynamic properties of RNA. *Methods in Enzymology*, **259**:242-261.
584. Bommarito S., Peyret N. and SantaLucia J. Jr. 2000. Thermodynamic parameters for DNA sequences with dangling ends. *Nucleic Acids Research*, **28**(9):1929-1934.
585. Chalikian T.V., Völker J, Plum G.E. and Breslauer K.J. 1999. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting; A characterization by calorimetric and volumetric techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:7853-7858.
586. Tikhomirova A., Taulier N. and Chalikian T.V. 2004. Energetics of nucleic acid stability. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**:16387-16394.
587. Kishore N., Bhat R. and Ahluwalia J.C. 1989. Thermodynamics of some nucleic acid bases and nucleosides in water, and their transfer to aqueous glucose and sucrose solutions at 298.15 K. *Biophysical Chemistry*, **33**:227- 236.
588. Privalov P. 2012. *Microcalorimetry of macromolecules. The Physical Basis of Biological Structures*. John Wiley & Sons.
589. Krugh Th.R., Wittlin F.N. and Cramer S.P. 1975. Ethidium bromide-dinucleotide complexes. Evidence for intercalation and sequence preferences in binding to double-stranded nucleic acids. *Biopolymers*, **14**:197-210.
590. Nelson J.W. and Tinoco I. JR. 1984. Intercalation of ethidium ion into DNA and RNA oligomers. *Biopolymers*, **23**:213-233.
591. Baguley B.C. and Falkenhaus E.-M. 1978. The intercalation of ethidium with double-stranded polynucleotides at low ionic strength. *Nucleic Acids Research*, **5**(1): 161-171.
592. Banerjee A., Singh J. and Dasgupta D. 2013. Fluorescence spectroscopic and calorimetry based approaches to characterize the mode of interaction of small molecules with DNA. *J. Fluoresc.*, **23**:745-752.
593. Peller L. 1976. On the free-energy changes in the synthesis and degradation of nucleic acids. *Biochemistry*, **15**(1):141-146.
594. Dickson K.S., Burns M.Ch. and Richardson J.P. 2000. Determination of the free energy change for the repair of a DNA Phosphodiester bond. *J. Biol. Chem.*, **275**:15828-15831.
595. Phillips R.C., George Ph. and Rutman R.J. 1969. Thermodynamic data for the hydrolysis of adenosine triphosphate as a function of pH, Mg²⁺ ion concentration, and ionic strength. *J. Biol. Chem.*, **244**:3330-3342.
596. Alberty R.A. 1969. Standard Gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates. *J. Biol. Chem.*, **244**:3290-3302.
597. Rudolf S.A., Jonson E.M. and Greengard P. 1971. The enthalpy of hydrolysis of various 3',5'- and 2',3'-cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **246**:1271-1273.
598. Goldberg R.N. and Tewari Y.B. 2003. Thermodynamics of hydrolysis reactions of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphate(aq) and phosphoenolpyruvate(aq); the standard molar formation properties of 3',5'(cyclic)phosphate(aq) and phosphoenolpyruvate(aq). *J. Chem. Thermodynamics*, **35**:1809-1830.
599. Gerlt J.A., Westheimer F.H. and Sturtevant J.M. 1975. The enthalpies of hydrolysis of acyclic, monocyclic, and glycoside cyclic phosphate diesters. *J. Biol. Chem.*, **250**:5059:5067.
600. Dubev T. and Lim C. 1998. Ring strain energies from ab initio calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**:4450-4458.
601. Chang N-Y. and Lim C. 1998. Factors governing the enhanced reactivity of five-membered cyclic phosphate esters. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**:2156-2167.
602. Dejaegere A. and Karplus M. 1993. Hydrolysis rate difference between cyclic and acyclic phosphate esters: solvation versus strain. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**:5316-5317.
603. Minetti C.A.S.A., Remeta D.P., Miller H., Gelfand C.A., Plum G.E., Grollman A.P. and Breslauer K.J. 2003. The thermodynamics of template-directed DNA synthesis: Base insertion and extension enthalpies. *PNAS*, **100**(25):14719-14724.
604. Bec G., Meyer B., Gerard M.-A., Steger J., Fauster K., Wolf Ph., Burnouf D., Micura R., Dumas Ph. and Enniafar E. 2013. Thermodynamics of HIV-1 reverse transcriptase in action elucidates the mechanism of action of non-nucleoside inhibitors. *Journal of American Chemical Society*, **135**(26):9743-9752.
605. Tribout M., Paredes S. and Léonis J. 1976. Investigation of ribonuclease-catalysed kinetics by a

- micro- calorimetric method. *Biochem. J.*, **153**:89-91.
606. Peskin Ch.S., Odell G.M. and Oster G.F. 1993. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophysical Journal*, **65**:316-324.
607. Dickson K.S., Burns Chr. M. and Richardson J.P. 2000. Determination of the free-energy change for repair of a DNA phosphodiester bond. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(21):15828:15831.
608. Minasov G., Tereshko V. and Egli M. 1999. Atomic-resolution crystal structures of B-DNA reveal specific influences of divalent metal ions on conformation and packing. *J Mol Biol*, **291**(1):83-99.
609. Kilburn D., Roh J.H., Guo L., Briber R.M. and Woodson S.A. 2010. Molecular crowding stabilizes folded RNA structure by the excluded volume effect. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**:8690-8696.
610. Kankia B.I. and Marky L.A. 2001. Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr²⁺: stability, heat and hydration. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10799-10804.
611. Lee J.S., Latimer L.J.P. and Reid S. 1993. A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn²⁺ and other divalent metal ions. *Biochemistry and Cell Biology*, **71**(3-4):162-168.
612. Mizoguchi K. 2011. Metal incorporated M-DNA: structure, magnetism, optical absorption. *Nanobiosystems: Processing, Characterization, and Applications IV*. Edited by Kobayashi Norihisa, Ouchen Fahima, Rau Ilena. *Proceedings of SPIE*, Volume 8103, article id. 810307, 10pp.
613. Pechlaner M. and Sigel R.K.O. 2012. Characterization of metal ion – nucleic acid interactions in solution. Chapter I in *Interplay Between Metal Ions and Nucleic Acids, Metal Ions in Life Sciences*. Sigel, H.Sigel and R.K.O. Sigel (eds). Springer Science+Business Media B.V.
614. Westhof E. 1988. Water: an integral part of nucleic acid structure. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **17**:125-144.
615. Schneider B., Patel K. and Berman H.M. 1998. Hydration of the phosphate group in double-helical DNA. *Biophysical Journal*, **75**:2422-2434.
616. Chalikian T.V., Sarvazyan A.P and Breslauer K.J. 1994. Hidration and partial compressibility of biological compounds. *Byophys. Chem.*, **51**:89:109.
617. Lee S.A., Tao N.-J. and Rupprecht A. 2012. A Raman scattering study of the interactions of DNA with its water of hydration. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI:10.1080/07391102.2012.736759
618. Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N.L. and Rau D.C. 1986. Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces. *Methods in Enzymology*, **127**:400-416.
619. Parsegian V.A., Rand R.P. and Rau D.C. 2000. Osmotic stress, crowding, preferential hydration and binding: A comparison of perspectives. *PNAS*, **97**(8):3987-3992.
620. Woolley P. and Wills.P. 1985. Excluded-volume effect of inert macromolecules on the melting of nucleic acids. *Biophysical Chemistry*, **22**:89-94.
621. Downey Ch.D., Crisman R.L., Randolph Th.W. and Pardi A. 2007. Influence of hydrostatic pressure and cosolutes on RNA tertiary structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(30):9290-9291.
622. Laurent T.C., Preston B.N. and Carlsson B. 1974. Conformational transitions of polynucleotides in polymer media. *Eur. J. Biochem.*, **43**:231-235.
623. Spink Ch. H. and Chaires J.B. 1999. Effects of hydration, ion release, and excluded volume on the melting of triplex and duplex DNA. *Biochemistry*, **38**:496-508.
624. Rozners E. and Moulder J. 2004. Hydration of short DNA, RNA and 2'-OMe oligonucleotides determined by osmotic stressing. *Nucleic Acids Research*, **32**(1):248-254.
625. Nakano Sh., Yamaguchi D., Tateishi-Karimata H., Miyoshi D. and Sugimoto N. 2012. Hydration changes upon DNA folding studied by osmotic stress experiments. *Biophysical Journal*, **102**:2808-2817.
626. Petrushka J., Sowers L.C. and Goodman M.F. 1986. Comparison of nucleotide interactions in water, proteins, and vacuum: model for DNA polymerase fidelity. *Proc. Natl. cad. Sci. USA*, **83**(6):1559-1562.
627. Hazen R.M. 2006. Mineral surfaces and the prebiotic selection and organization of biomolecules. *American Mineralogist*, **91**: 1715-1729.
628. Miyoshi D., Nakamura K., Tateishi-Karimata H., Ohmichi T., and Sugimoto N. 2009. Hydration of Watson- Crick base pairs and dehydration of Hoogsteen base pairs inducing structural polymorphism under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**:3522-3531.
629. Schultze P., Hud N.V., Smith F.W. and Feigon J. 1999. The effect of sodium, potassium and ammonium ions on the conformation of the dimeric quadruplex formed by the *Oxytricha nova* telomere repeat oligonucleotide d(G₄T₄G₄). *Nucleic Acids Research*, **27**(15):3018-3028.
630. Fan H. Y., Shek Y.L., Amiri A., Dubins D.N., Heerklotz H., Macgregor R.B., Jr. and Chalikian T.

- V. 2011. Volumetric characterization of sodium-induced G-quadruplex formation. *Journal of the American Chemical Society*, **133**:4518-4526.
631. Lane A.N., Chaires J.B., Gray R.D. and Trent J.O. 2008. Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.*, 36(17):5482-515.
632. Miyoshi D., Karimata H. and Sugimoto N. 2006. Hydration regulates thermodynamics of G-quadruplex formation under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**:7957-7963.
633. Spink C.H. and Chaires J. B. 1995. Selective stabilization of triplex DNA by poly(ethyleneglycols) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**(51):12887-12888.
634. Goobes R. and Minsky A. 2001. Thermodynamic aspects of triplex DNA formation in crowded environments. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**:12692-12693.
635. Tateishi-Karimata H., Nakano M. and Sugimoto N. 2014. Comparable stability of Hoogsteen and Watson-Crick base pairs in ionic liquid choline dihydrogen phosphate. *Scientific Reports. DNA Biochemistry and Chemistry*. **4**:3593 (7 pages).
636. Neto B.A.D. and Lapis A.A.M. 2009. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules*, **14**:1725-1746.
637. X. and Chaires J.B. 2001. Hydration changes for DNA intercalation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, **123**(1):1-7.
638. Yu H., Ren J., Chaires J.B. and Qu X. 2008. Hydration of drug-DNA complexes: Greater water uptake for adriamycin compared to daunomycin. *Med. Chem.*, **51**:5909-5911.
639. Takahashi Sh. and Sugimoto N. 2013. Effect of pressure on thermal stability of G-quadruplex and double-stranded DNA structures. *Molecules*, **18**:13297-13319.
640. Giel-Pietraszuk M. and Barciszewski J. 2005. A nature of conformational changes of yeast tRNA^{Phe}: High hydrostatic pressure effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, **37**:109-114.
641. Lin M.-C., Eid P., Wong P.T. and Macgregor R.B. 1999. High pressure Fourier transform infrared spectroscopy of poly(dA)poly(dT), poly(dA) and poly(dT). *Biophys. Chem.*, **76**:87-94.
642. Girard E., Prangé Th., Dhaussy A.-C., Migianu-Griffoni E., Lecouvey M., Chervin J.-C., Mezuar M., Kahn R. and Fourme R. 2007. Adaptation of the base-paired double-helix molecular architecture to extreme pressure. *Nucleic Acids Research*, **35**(14):4800-4808.
643. Wilton D.J., Ghosh M., Chary K.V.A., Akasaka K. and Williamson M.P. 2008. Structural change in a B-DNA helix with hydrostatic pressure. *Nucleic Acids Research*, **2008**, **1-6**
doi:10.1093/nar/ghn350
644. Hughes F. and Steiner, R. 1966. Effects of pressure on the helix-coil transitions of the polyA-polyU system. *Biopolymers*, **4**:1081-1090.
645. Rayan G. and Macgregor R.B., Jr. 2009. Pressure-induced helix-coil transition of DNA copolymers is linked to water activity. *Biophysical Chemistry*, **144**:62-66.
646. Rayan G. and Macgregor R.B., Jr. 2005. Comparison of the heat and pressure-induced helix-coil transition of two DNA copolymers. *J. Phys. Chem. B*, **109**(32):15558-15565.
647. Najaf-Zadeh R., Wu J.Q. and Macgregor R.B., Jr. 1995. Effect of cations on the volume of the helix-coil transition of poly[d(A-T)]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1262**:52-58.
648. Shi X. and Macgregor R.B. 2007. Effect of cesium on the volume of the helix-coil transition of dA·dT polymers and their ligand complexes. *Biophysical Chemistry*, **130**:93-101.
649. Macgregor R.B., Jr. 1996. Chain length and oligonucleotide stability at high pressure. *Biopolymers*, **38**:321-327.
650. Wu J.Q. and Macgregor R.B., Jr. 1993. Pressure dependence of the melting temperature of dA·dT polymers. *Biochemistry*, **32**:12531-12537.
651. Macgregor R.B., Jr. 2002. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1595**:266-276.
652. Suzuki K., Taniguchi Yo. and Miyosawa Yo. 1974. The effect of pressure on the absorption spectra of DNA and DNA-Dye complex. *J. Biochem.*, **72**:1097-1091.
653. Han F. and Chalikian T.V. 2003. Hydration changes accompanying nucleic acid intercalation reactions: volumetric characterization. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**:7219-7229.
654. Shi X. and Macgregor R.B., Jr. 2006. Temperature dependence of the volumetric parameters of drug binding to Poly[d(A-T)]·Poly[d(A-T)] and Poly(dA)·Poly(dT). *Biophysical Journal*, **90**:1729-1738.
655. Shi X. and Macgregor R.B., Jr. 2007. Volume of hydration changes of DNA-ligand interactions.

- Biophysical Chemistry*, **125**:471-482.
656. Kishore N. and Ahluwalia J. 1990. Partial molar heat capacities and volumes of some nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides in aqueous urea solutions at 298.15 K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **86**(6):905- 910.
 657. Buckin V.A., Kankiya B.I., Sarvazyan A.P. and Uedaira H. Acoustical investigation of poly(dA)·poly(dT), poly[d(A-T)]·poly[d(A-T)], Poly(A)·poly(U) and DNA hydration in dilute aqueous solutions. 1989. *Nucleic Acids Research*, **17**(11):4189-4203.
 658. Chalikian T.V., Sarvazyan A.P., Plum E. and Breslauer K.J. 1994. Influence of base composition, base sequence, and duplex structure of DNA hydration: Apparent molar volume and apparent molar adiabatic compressibilities of synthetic and natural DNA duplexes at 25° C. *Biochemistry*, **33**:2394-2401.
 659. Kankiya B.I. 2000. Interaction of alkaline-earth metal ions with calf thymus DNA. Volume and compressibility effects in diluted aqueous solutions. *Biophysical Chemistry*, **84**:227-237
 660. Lynch Th.W., Kosztin D., McLean M.A., Schulten K. and Sligar S.G. 2002. Dissecting the molecular origins of specific protein-nucleic acid recognition: hydrostatic pressure and molecular dynamics. *Biophysical Journal*, **82**:93-98.
 661. Tang G.-Q., Tanaka N. and Kunugi Sh. 1998. In vitro increases in plasmid DNA supercoiling by hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1443**:364-368.
 662. Masson P. and Balny C. 2005. Linear and non-linear pressure dependence of enzyme catalytic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1724**:440-450.
 663. Tobé S., Heams Th., Vergne J., Hervé G. and Maurel M.-Ch. 2005. The catalytic mechanism of hairpin ribozyme studied by hydrostatic pressure. *Nucleic Acids Research*, **33**(8):2557-2564.
 664. Hervé G., Tobé S., Heams Th., Vergne J. and Maurel M.-Ch. 2006. Hydrostatic and osmotic pressure study of the hairpin ribozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1764**:573-577.
 665. Ztouti M., Kaddour H., Miralles F., Simian Ch., Vergne J., Hervé G. and Maurel M.-Ch. 2009. Adenine, a hairpin ribozyme cofactor – high pressure and competition studies. *FEBS Journal*, **276**:2574-2588.
 666. Krzyzosiak W.J., Marciniak M., Wiewiorowski P., Romby P., Ebel J.P. and Giegé R. 1988. Characterization of the lead-induced cleavage in tRNA in solution and effect of the Y-base removal in yeast tRNA^{Phe}. *Biochemistry*, **27**:5771-5777.
 667. Giel-Pietraszuk M. and Barciszewski J. 2012. Hydrostatic and osmotic pressure study of the RNA hydration. *Mol. Biol. Rep.*, **39**:6309-6318.
 668. Wedelind L.E. and McKay D.B. 2003. Crystal structure of the leadzyme at 1.8 Å resolution: Metal ion binding and the implications for catalytic mechanism and allo site ion regulation. *Biochemistry*, **42**:9554-9563.
 669. Kaddour H., Vergne J., Hervé G. and Maurel M.-Ch. 2011. High-pressure analysis of a hammerhead ribozyme from *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* reveals two different populations of self-cleaving molecules. *FEBS Journal*, **278**:3739-3747.
 670. Lundin D., Gribaldo S., Torrents E., Sjöberg B.-M. and Poole A.M. 2010. Ribonucleotide reduction – horizontal transfer of a required function spans all three domains. *Evolutionary Biology*, **10**:383-402.
 671. Gernann M.W. Aramini J.M., Kalisch B.W., Pon R.T. and van de Sande J.M. 1997. DNA duplexes containing alpha-anomeric nucleotides and polarity reversals: coexistence of parallel and antiparallel DNA. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **16**(7-9):1481-1485.
 672. Aramini J.M. and Gernann M.W. 1998. NMR studies of DNA duplexes containing α -anomeric nucleotides and polarity reversals. *Biochem. Cell Biol.*, **76**:403-410.
 673. Sáenz J.P., Sezgin E., Schwille P. and Simons. K. 2012. Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *PNAS* **109**(35):14236–14240.
 674. Ricci J.N., Coleman M. L., Welander P.V., Sessions A.L., Summons R.E., Spear J.R. and Newman D.K. 2014. Diverse capacity for 2-methylhopanoid production correlates with a specific ecological niche. *The ISME Journal* **8**:675–684.
 675. Neunlist S. and Rohmer M. 1985. A novel hopanoid, 30-(5'-adenosyl)hopane, from the purple non-sulphur bacterium *Rhodospirillum rubrum*, with possible DNA interactions. *Biochem. J.* **228**:769-771.
 676. Bradley A. S., Pearson A., Sáenz J. P., Marx Ch. J. 2010. Adenosylhopane: The first intermediate in hopanoid side chain biosynthesis. *Organic Geochemistry* **41**:1075-1081.
 677. Tredwin Ch.J. 2009. *Sol-Gel Derived Hydroxyapatite, Fluorhydroxyapatite and*

- Fluorapatite Coatings for Titanium Implants*. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy, University College London.
678. Roy S.W. and Irimia M. 2012. Genome evolution: Where do new introns come from? *Current Biology* **22**(13):R529-R531.
679. Saldanha R., Mohr G., Belfort M. and Lambowitz A.M. 1993. Group I and group II introns. *The FASEB Journal*, **7**:15-24.
680. Turmel M., Côté V., Otis Ch., Mercier J.-P., Gray M.W., Lonergan K.M, and Lemieux C. 1995. Evolutionary transfer of ORF-containing Group I introns between different subcellular compartments (chloroplast and mitochondrion). *Mol. Biol. Evol.* **12**(4):533-545.
681. Abelson J., Trotta Ch. R. and Li H. 1998. tRNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**:12685-12688.
682. Bhattacharya D., Friedl Th., and Damberger S.1996. Nuclear-encoded rDNA Group I introns: Origin and phylogenetic relationships of insertion site lineages in the green algae. *Mol. Biol. Evol.* **13**(7):978-989.
683. Harris L.B. and Rogers S. O. 2011. Evolution of small putative group I introns in the SSU rRNA gene locus of *Phialophora* species. *BMC Research Notes*, **4**:258.
684. Hausner G., Hafez M.and Edgell D. R. 2014. Bacterial group I introns: mobile RNA catalysts. *Mobile DNA* 2014, **5**:8.
685. Irimia M. and Roy S. W. 2014. Origin of spliceosomal introns and alternative splicing. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;**6**:a016071.
686. Herschlag D. and Cech. Th.R.1990. Catalysis of RNA cleavage by the *Tetrahymena thermophila* ribozyme. I. Kinetic description of the reaction of an RNA substrate complementary to the active site. *Biochemistry*, **29**:10159-10171.
687. Beaudry A.A. and Joyce G.F. 1992. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science*, **257**:635-641.
688. Piccirilli J. A., McConnell T. S., Zaug A. J., Noller H. F., Cech Th. R.1992. Aminoacyl esterase activity of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science*, **256**:1420-1424.
689. Hager A.J., Pollard J.D., Jr and Szostak J.W. 1996. Ribozymes: aiming at RNA replication and protein synthesis. *Chemistry and Biology*, **3**:717-725.
690. Koonin Eu. V., Senkevich T. G. and Dolja V. V. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology Direct* 2006, **1**:29.
691. Cech Th. R., Tanner N. K., Tinoco I., JR., Weir B.R., Zuker M.and Perlman Ph.S. 1983. Secondary structure of the *Tetrahymena* ribosomal RNA intervening sequence: Structural homology with fungal mitochondrial intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry* **80**:3903-3907.
692. F. Michel and Feral J.-L. 1995. Structure and activities of group II introns. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:435-461.
693. Bartel D. P., Doudna J. A. Usman N. and Szostak J. W. 1991. Template-directed primer extension catalyzed by the *Tetrahymena* ribozyme. *Molecular and Cellular Biology*, **11**:3390-3394.
694. Poole A., Penny D. and Sjöberg B.-M. 2001. Confounded cytosine! Tinkering and the evolution of DNA. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**:147-151.
695. Hitzemsn R.A. and Price A. R. 1978. Relationship of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III to bacteriophage PBS2-induced DNA polymerase and to the replication of uracil-containing DNA. *Journal of Virology* **28**(3):697-709.
696. Gräslund A., Sahlin M., and Sjöberg B.-M..1985. The tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase. *Environmental Health Perspectives*, **64**:139-149.
697. Freeland S.J., Knight R.D. and Landweber L.F. 1999. Do proteins predate DNA? *Science* **286**(5440):690-692.
698. Stern A., Mayrose I., Penn O., Shaul Sh., Gophna U. and Purko T. 2010. An evolutionary analysis of lateral gene transfer in thymidylate synthase enzymes. *Syst. Biol.* **59**(2):212-225.
699. Rest J. S. and Mindell D. P. 2003. Retroids in Archaea: Phylogeny and lateral origins. *Mol. Biol. Evol.* **20**(7):1134–1142.
700. Eickbush, T.H. 1994. Origin and evolutionary relationships of retroelements. In *The evolutionary biology of viruses* (ed. S.S. Morse), pp. 121-157. Raven Press, Ltd., New York.
701. Boeke J. D. 2003. The unusual phylogenetic distribution of retrotransposons: a hypothesis. *Genome Res.* **13**(9):1975-1983.
702. Toro N. and Nisa-Martinez R. 2014. Comprehensive phylogenetic analysis of bacterial reverse transcriptases. *PLoS ONE* **9**(11): e114083.
703. Gladyshev E.A. and Arkhipova I.R. 2007. Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-

- like retroelements in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:9352-9357.
704. Gladyshev E. A. and Arkhipova I. R. 2011. A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes. *PNAS* **108**(51): 20311-20316.
705. Shutt T.E. and Gray M. W. 2006. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *TRENDS in Genetics* **22**(2):90-95.
706. Cheatham G. M. T. and Steitz Th. A. 1999. Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* **286**(17):2305-2309.
707. Lane W. J. and Darst S. A. 2010. Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: Sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **395**:671-685.
708. Lacks S., Greenberg B. and Neuberger M. 1974. Role of a deoxyribonuclease in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**(6):2305-2309.
709. Iyer L. M., Koonin Eu. V. and Aravind L. 2003. Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Structural Biology* 2003, **3**:1.
710. Xiong Y. and Eickbush Th. H., 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO Journal* **9**(10): 3353-3362.
711. Mielcarek M., Barciszewska M. Z., Sałanski P., Stobiecki M., Jurczak J., and Barciszewski J. 2002. Native transfer RNA catalyzes Diels-Alder reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294** :145-148.
712. Kryżaniak A. and Barciszewski J. 1994. The non-enzymatic specific amino-acylation of transfer RNA at high pressure. *Int. J. Macromol.* **16**(3):153-158.
713. Kryżaniak A., Sałanski P., Twardowski T., Jurczak J. and Barciszewski J. 1998. tRNA aminoacylated at high pressure is a correct substrate for protein biosynthesis. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **45**(3):489-500.
714. Zaug A. J., Grabowski P. J. and Cech Th. R. 1983. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature*, **301**:578-583.
715. Nielsen H., Fiskaa T., Birgisdottir A. B., Haugen P., Einvik Ch. and Johansen S. 2003. The ability to form full-length intron RNA circles is a general property of nuclear group I introns. *RNA* (2003), **9**:1464-1475.
716. Lambowitz, A.M. and Zimmerly, S. 2011. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. In: *The RNA Worlds*, 4th Edition (R.V. Gesteland, T.R. Cech, and J.F. Atkins, Editors), Cold Spring Harbor Press Perspect. Biol. **3**(8), a003616.
717. Edgell D. R., Belfort M. and Shub D. A. 2000. Barriers to intron promiscuity in bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182**(19): 5281-5289.
718. Paquin, B. and Shub, D.A. 2001. Introns: Group I structure and function. In *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, London.
719. Trotta Ch.R. and Abelson J. 1999. tRNA splicing: An RNA World add-on or an ancient reaction? Ch. 21 in *The RNA World, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
720. Yoshihisa T. 2014. Handling tRNA introns, archaeal way and eukaryotic way. *Frontiers in Genetics*. Vol. **5**, Article 213
721. Kozak M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208.
722. Kolitz S. E. and Lorsch J. R. 2010. Eukaryotic Initiator tRNA: Finely tuned and ready for action. *FEBS Lett.* **584**(2): 396-404.
723. Laursen B. S., Sørensen H. P., Mortensen K.K. and Sperling-Petersen H. U. 2005. Initiation of protein synthesis in Bacteria. 2005. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**(1):101-123.
724. Sherman F, Stewart J. W. and Tsunasawa S. 1985. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays*, **3**(1):27-31.
725. Youngman, E. M., McDonald, M. E. and Green, R. 2008. Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**:353-373.
726. Kobayashi K., Saito K., Ishitani R., Ito K. and Nureki O. 2012. Simplification of the genetic code: restricted diversity of genetically encoded amino acids. *Nucleic Acids Research* **40**(18):9319-9328.
727. Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A. L., Celis, J. E., Philippe, M., Justesen, J., and Kisselev, L. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* **372**:701-703.
728. Dontsova, M., Frolova, L., Vassilieva, J., Piendl, W., Kisselev, L. and Garber, M. 2000. Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic

- ribosomes. *FEBS Lett.* **472**:213-216.
729. Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. 1968. Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **61**:768-774.
730. Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J. Y., Trakhanov, S. and Noller, H. F. 2008. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*, **454**:852-857.
731. Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R. M., Petry, S., Kelley, A. C. and Ramakrishnan, V. 2008. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science*, **322**:953-956.
732. Elzanowski A. and Ostell J. 2010. "The Genetic Codes". National Center for Biotechnology Information (NCBI).
733. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, et al. 1997. The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**:1453-1462.
734. Rocha EPC, Danchin A, Viari A. 1999. Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res.* **27**:3567-3576
735. Torarinsson E, Klenk HP, Garrett RA. 2005. Divergent transcriptional and translational signals in Archaea. *Environ. Microbiol.* **7**:47-54.
736. Ivanov I. P., Firth A. E., Michel, A. M., Atkins J. F. and Baranov P. V. 2011. Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences *Nucleic Acids Research*, **39**(10):4220-4234
737. Crosby M. A., Gramates L. S. dos Santos G. Matthews B. B., St. Pierre S. E., Zhou P., Schroeder A. J. Falls K. Emmert D. B., Russo S. M., Gelbart W. M., and the FlyBase Consortium. 2015. Gene model annotations for *Drosophila melanogaster*: the rule-benders. *G3: Genes/Genomes/Genetics*. **5**(8):1737-1749.
738. Menschaert, G., W. Van Crielinge, T. Notelaers, A. Koch, J. Crappe et al. 2013 Deep proteome coverage based on ribosome profiling aids mass spectrometry-based protein and peptide discovery and provides evidence of alternative translation products and near-cognate translation initiation events. *Mol. Cell. Proteomics* **12**:1780-1790.
739. Schmitz J., Pruffer D., Rohde W. and Tacke E. 1996. Non-canonical translation mechanisms in plants: efficient *in vitro* and *in planta* initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence. *Nucleic Acids Research*, **24**(2):257-263.
740. Riechmann J. L., Ito T. and Meyerowitz E. M. 1999. Non-AUG Initiation of *AGAMOUS* mRNA Translation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology* **19**(9):8505-8512.
741. Kozak M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* **266**:19867-19870.
742. Barraud P., Schmitt E., Mechulam Y., Dardel F. and Tisné C. 2008. A unique conformation of the anticodon stem-loop is associated with the capacity of tRNA^{Met} to initiate protein synthesis. *Nucleic Acids Research*, **36**(15):4894-4901.
743. Peabody, D. S., 1989 Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **264**:5031-5035.
744. Meinnel T., Mechulam Y. and Blanquet S. 1993. Methionine as translation start signal: A review of the enzymes of the pathway in Escherichia coli. *Biochimie* **75**:1061-1075.
745. RajBhandry U. L. 2000. More surprises in translation: Initiation without the initiator RNA. *PNAS* **97**(4):1325-1327.
746. Sasaki J. and Nakashima N. 2000. Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *PNAS* **97**(4):1512-1515.
747. Keeling P. J. and Doolittle W. F. 1997. Widespread and ancient distribution of a noncanonical genetic code in Diplomonads. *Mol Biol Evol.* **14**(9):895-901.
748. Keeling P. J. and Leander B. S. 2003. Characterisation of a non-canonical genetic code in the *Oxymonad Streblomastix strix*. *J. Mol. Biol.* **326**:1337-1349.
749. Tourancheau A. B., Tsao N., Klobutcher L. A., Pearlman R. E. and Adoutte A. 1995. Genetic code deviations in the ciliates: evidence for multiple and independent events. *The EMBO Journal* **14**(13): 3262-3267.
750. Inamine J. M., Ho K.-Ch., Loechel S., and HU P.-Ch. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Bacteriology* **172**(1):504-506.
751. Yamao F., Muto A., Kawachi Y., Iwami M., Iwagami Sh. J., Azumi Y. and Osawa S. 1985. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2306-2309.

752. Lozupone C.A., Knight R.D. and Landweber L.F. 2001. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Current Biology* **11**:65-74.
753. Swire J., Judson O.P. and Burt Au. 2005. Mitochondrial genetic codes evolve to match amino acid requirements of proteins. *J Mol Evol* **60**:128-139.
754. Lukashenko N.P. 2009. Evolutionary deviations from the universal genetic code in ciliates. *Russian Journal of Genetics*, **45**(4):379-388.
755. Kim O. T. Ph., Yura K., Go N., Harumoto T. 2005. Newly sequenced eRF1s from ciliates: the diversity of stop codon usage and the molecular surfaces that are important for stop codon interactions. *Gene* **346**: 277-286.
756. Liang A., Brünen-Nieweler C., Muramatsu T., Kuchino Yo., Beier H. and Heckmann K. 2001. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. *Gene* **262**:161-168.
757. Liang H., Wong J.Y., Bao Q., Cavalcanti A.R.O., Landweber L.F. 2005. Decoding the decoding region: analysis of eukaryotic release factor (eRF1) stop codon-binding residues. *J Mol Evol* **60**:337-344
758. Kim O. T.Ph., Sakurai A., Saito K., Ito K., Ikehara K., T. Harumoto 2008. Ciliates use both variant and universal genetic codes: Evidence of omnipotent eRF1s in the class Litostomatea. *Gene* **417**:51-58.
759. Gaston M. A., 2011. Biosynthesis of pyrrolysine, the 22nd amino acid. *Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University. Graduate Program in Microbiology The Ohio State University.*
760. Theobald-Dietrich A., Giege R. and Rudinger-Thirion J. 2005. Evidence for the existence in mRNAs of a hairpin element responsible for ribosome dependent pyrrolysine insertion into proteins. *Biochimie* **87**:813-817.
761. Longstaff D. G., Blight Sh. K., Zhang L., Green-Church K.B. and Krzycki J. A. 2007. *In vivo* contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine. *Molecular Microbiology* **63**(1):229-241.
762. Yuan J., O'Donoghue P., Ambrogelly A., Gundllapalli S., Sherrer R. L., Palioura S., Simonović, and Söll D. 2011. Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *FEBS Lett.* **584**(2):342-349.
763. Borrel G., Gaci N., Peyret P., O'Toole P.W., Gribaldo S., and Brugere J.-F. 2014. Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette. *Archaea* Volume **2014**, Article ID 374146, 11 pages.
764. S. Commans and Böck A. 1999. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiology Reviews* **23**:335-351
765. Xu X.M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Glass R.S., Berry M.J., Gladyshev V.N. and Hatfield D.L. 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol.* **5**(1):e4.
766. Fomenko D. E., Xing W., Adair B. M., Thomas D. J. and Gladyshev V.N. 2007. High-throughput identification of catalytic redox-active cystein residues. *Science* **315**(5810):387-389.
767. Rother M. and Krzycki J.A. 2010. Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea. *Archaea*, Volume **2010**, Article ID 453642, 14 pages.
768. Turanov A.A., Lobanov A.V., Fomenko D.E., Morrison H.G., Sogin M.L., Klobutcher L.A., Hatfield D.L. and Gladyshev V.N. 2009. Genetic code supports targeted insertion of two amino acids by one codon. *Science*. **323**(5911):259-261.
769. Jungreis I., Lin M.F., Spokony R., Chan C.S., Negre N., Victorsen A., White K.P., and Kellis M. 2011. Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa. *Genome Res.* **21**(12):2096-2113.
770. Huang X., Cheng Q., and Du Zh. 2013. A genome-wide analysis of RNA pseudoknots that stimulate efficient ribosomal frameshifting or readthrough in animal viruses. *BioMed Research International* Volume **2013**, Article ID 984028, 15 pages.
771. Jalajakumari, M. B., Thomas, C. J., Halter, R. & Manning, P. A. 1989. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CF4II enterotoxigenic *Escherichia coli* : novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. *Mol Microbiol.* **3**:1685-1695.
772. Von der Haar T. and Tuite M. F. Regulated translational bypass of stop codons in yeast. *TRENDS in Microbiology* **15**(2):78-86.
773. G. Loughran, M.-Yu. Chou, Ivanov I. P., Jungreis I., Kellis M., Kiran A. M., Baranov P. V. and Atkins J. F. 2014. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Research*, **42**(14):8928-8938.

774. Agris P. F., Vendeix F. A. P. and Graham W. D. 2007. tRNA's Wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* **366**:1-13.
775. Moore P. B. 1999. Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:287-300.
776. Akins R. A. and Lambowitz A.M. 1987. A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell* **50**:331-345.
777. Kandler, 1998. The early diversification of life and the origin of the three domains, a proposal, in: J. Wiegand, M.W.W. Adams (Eds.), *Thermophiles: The Keys to Molecular Evolution and the Origin of Life*, Taylor and Francis, 1998, pp. 19-28.
778. Koga Y., Kyuragi T., Nishihara M. and Sone N. 1998. Archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerophosphate backbones caused the separation of the two lines of descent, *J. Mol. Evol.* **46**:54-63.
779. Martin W., Russell M.J., 2003. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells, *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **358**:59-83.
780. Meng, Q., Y. Zhang, and X. Q. Liu. 2007. Rare group I intron with insertion sequence element in a bacterial ribonucleotide reductase gene. *J. Bacteriol.* **189**:2150-2154.
781. Tourasse, N. J., and A. B. Kolsto. 2008. Survey of group I and group II introns in 29 sequenced genomes of the *Bacillus cereus* group: insights into their spread and evolution. *Nucleic Acids Res.* **36**:4529-4548.
782. Ichihara K., Beauregard A. and Belfort M. 2003. A bacterial group II intron favors retrotransposition into plasmid targets. *PNAS* **100**(26): 15742-15747.
783. Tanaka Sh., Lee S.-O., Hamaoka K., Kato J., Takiguchi N., Nakamura K., Ohtake H., and Kuroda A. 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorus*. *Journal of Bacteriology*, **185**(18):5654-5656.
784. Wild Th. and Cramer P. 2012 Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Biochemical Sciences*, **37**(3):99-105.
785. Hansen J. L., Long A. M. and Schultz S. C. 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**(8):1109-1122.
786. Jukes T.H. and Osawa S. 1990 The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia*. **46**(11-12):1117-1126.
787. Bienstock R.J., Beard W.A. and Wilson S.H. 2014. Phylogenetic analysis and evolutionary origins of DNA polymerase X-family members. *DNA Repair* **22**:77-88.
788. Cramer P. 2002. Common structural features of nucleic acid polymerases. *BioEssays* **24**:724-729.
789. Krishna S. S., Majumdar I. and Grishin N. V. 2003. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research*, **31**(2):532-550.
790. Gargas A., DePriest P.T., Taylor J.W. 1995. Positions of multiple insertions in SSU rDNA of lichen-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* **12**(2):208-218.
791. Turmel M., Guttel R.R., Otis Ch. and Lemieux C. 1993. Analysis of chloroplast large subunit ribosomal RNA gene from 17 *Chlamydomonas* taxa. *J. Mol. Biol.* **232**:446-467.
792. Roman J. and Woodson S.A. 1995. Reverse splicing of the Tetrahymena IVS: Evidence for multiple reaction sites in the 23S rRNA. *RNA*, **1**:478-490.
793. Mohr G. and Lambowitz A. 1991. Integration of a group I intron into a ribosomal RNA sequence promoted by a tyrosyl-tRNA synthetase. *Nature* **354**:164-167.
794. Koonin E.V. 2010. The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology* **11**(5):209.
795. Burki F. 2014. The Eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* **6**(5):a016147.
796. Martijn J. and Ettema Th. J.G. 2013. From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell. *Biochem. Soc. Trans.* **41**:451-457.
797. Forterre P. 2013. The common ancestor of Archaea and Eukarya was not an Archaeon. *Archaea* Volume **2013**, Article ID 372396, 18 pages.
798. Lombard J., López-García P., and Moreira D. 2012. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, **10**(7):507-515.
799. Martin W., Koonin E.V. 2006. Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentation. *Nature*

- 440:41-45.
800. Mans B.J., Anantharaman V., Aravind L. and Koonin E.V. 2004. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* **3**(12):1612-1637.
 801. Dahlberg J. E., Lund E., and Goodwin E.B. 2003. Nuclear translation: What is the evidence? *RNA*. **9**(1):1-8.
 802. Reid D.W. and Nicchitta Ch.V. 2012. The enduring enigma of nuclear translation. *J Cell Biol.* **197**(1):7-9.
 803. David A., Dolan B.P., Hickman H.D., Knowlton J.J., Clavarino G., Pierre P., Bennink J.R. and Yewdell J.W.. 2012. Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J. Cell Biol.* **197**:45-57.
 804. Al-Jubran Kh., Wen J., Abdullahi A., Chaudhury S. R., Li M., Ramanathan P., Matina A., De S., Piechocki K., Rugjee K. N. and Brogna S. 2013. Visualization of the joining of ribosomal subunits reveals the presence of 80S ribosomes in the nucleus. *RNA*. **19**(12):1669-1683.
 805. Keeling P. J. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**:729-748.
 806. Adams K.L. and Palmer J.D. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**:380-395.
 807. Sheiner L. and Striepen B. 2013. Protein sorting in complex plastids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1833**:352-359.
 808. Reyes-Prieto A., Hackett J.D., Soares M.B., Bonaldo M.F. and Bhattacharya D. 2006. Cyanobacterial contribution to algal nuclear genomes is primarily limited to plastid functions. *Curr Biol.* **16**(23):2320-2325.
 809. Henze K. and Martin W. 2001. How do mitochondrial genes get into the nucleus? *TRENDS in Genetics* **17**(7):383-387.
 810. Lithgow T. and Schneider A. 2010. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**:799-817.
 811. Bruce B. D. 2001. The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1541**:2-21.
 812. Patron N.J. and Waller R.F. 2007. Transit peptide diversity and divergence: a global analysis of plastid targeting signals. *BioEssays* **29**:1048-1058.
 813. Novikova O., Topilina N. and Belfort M. Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins. 2014. *Journal of Biological Chemistry* **289**(21):14409-14497.
 814. Chevalier B. S. and Stoddard B.L. 2001. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res.* **29**(18): 3757-3774.
 815. Kane P. M., Yamashiro C. T., Wolczyk D. F., Neff N., Goebel M., and Stevens T. H. 1990. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase. *Science* **250**:651-657.
 816. Haugen P., Simon D. M. and Bhattacharya D. 2005. The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* **21**(2):111-119.
 817. Stoddard B.L. 2014. Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mobile DNA* 2014, 5:7
 818. Haugen P., Reeb V., Lutzoni F., and Bhattacharya D. 2004. The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA. *Molecular Biology and Evolution* **21**(1):129-140.
 819. Raghavan R. and Minnick M.F. 2009. Group I introns and inteins: disparate origins but convergent parasitic strategies. *Journal of Bacteriology* **191**(20):6193-6202.
 820. Zimmerly S. and Semper C. 2015. Evolution of group II introns. *Mobile DNA* (2015) 6:7 (19 pages).
 821. Lang B. F., Laforest M.-J. and Burger G. 2007. Mitochondrial introns: a critical view. *TRENDS in Genetics* **23**(3):119-125.
 822. Irimial M. and Roy S. W. 2014. Origin of spliceosomal introns and alternative splicing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**; 6:a016071 (22 pages).
 823. Cavalier-Smith T. 1991. Intron phylogeny: A new hypothesis. *Trends Genet* **7**:145-148.
 824. Koonin EV. 2006. The origin of introns and their role in eukaryogenesis: A compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol Direct* **1**: 22.
 825. Dai L, Zimmerly S. 2003. ORF-less and reverse-transcriptase-encoding group II introns in archaeobacteria, with a pattern of homing into related group II intron ORFs. *RNA* **9**:14-19.
 826. Samson R.Y. and Bell S.D. 2011. Cell cycles and cell division in the archaea. *Current Opinion in Microbiology*, **14**:350-356.

827. Bogdanov Yu. F. 2003. Variation and evolution of meiosis. *Russian Journal of Genetics*, **39**(4):363-381.
828. Bernstein H., Bernstein C. and Michod R.E. 2011. Meiosis as an evolutionary adaptation for DNA repair. Chapter 19 in *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. "DNA Repair"*. Ed. by Inna Kruman, Published November 7, 2011.
829. Бабынин Э.В. 2007. Молекулярный механизм гомологичной рекомбинации в мейозе: происхождение и биологическое значение. *Цитология*, **9**(3):183-193.
830. Hurst L.D. and Peck J.R. 1996. Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends Ecol Evol* **11**(2):A46-A52
831. Kondrashov A.S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* **336**:35-440.
832. Alberts B, Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M. and Walter P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. Published by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, UK.
833. Keeney S. 2008. Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genome Dyn Stab* **2**:81-123.
834. San Filippo J., Sung P. and Klein H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**:229-257.
835. Seitz E.M., Brockm J.P., Sandler S.J., Clark A.J. and Kowalczykowski S.C. 1998. RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange. *Genes Dev.* **12**(9):128-1253.
836. Cox M.M. 2007. Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Biol.* **42**(1):41-63.
837. Berchowitz L.E. and Copenhaver G.P. 2010. Genetic interference: don't stand too close to me. *Curr Genomics* **11**(2):91-102.
838. Rosu S., Libuda D.E. and Villeneuve A.M. 2011. Robust crossover assurance and regulated interhomolog access maintain meiotic crossover number. *Science* **334**:1286-1289.
839. Krishnaprasad G.N., Anand M.T., Lin G., Tekkedil M.M., Steinmetz L.M. and Nishant K.T. 2015. Variation in crossover frequencies perturb crossover assurance without affecting meiotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **199**(2):399-412.
840. Kang J., Hang S. and Blaser M.J. 2005. Structural and functional divergence of Mts2 from bacterial Muts1 and eucariotic MSH4-MSH5 homologs. *J. Bacteriol.* **187**(10):3528-3537.
841. Соффер В.Н. 1997. Репарация генетических повреждений. *Соросовский образовательный журнал* №8 стр. 4-13.
842. Claverys J.P., and Havarstein L.S. 2002. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumonia*. *Front. Biosci.* **7**:d1798:d181.
843. Jonsborg O. and Havarstein L.S. 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumonia*. *FEMS Microbiol Rev.* **33**(3):627-642.
844. Noelzer M.A. and Michod R.E. 1991. DNA repair and the evolution of transformation in *Bacillus subtilis*. III. Sex with damaged DNA. *Genetics* **128**(2):215-223.
845. Bernstein H. and Bernstein C. 2010. Evolutionary origin of recombination during meiosis. *BioScience* **60**(7):98-505.
846. Cox M.M. 1991. The RecA protein as a recombinational repair system. *Mol Microbiol.* **5**(6):1295-1299.
847. Zawadzki P. and Cohan F.M. 1995. The size and continuity of DNA segments integrated in Bacillus transformation. *Genetics* **141**(4):1231-1243.
848. Game J.C., Zamb T.J., Braun R.J., Resnick M. and Roth R.M. 1980. The role of radiation (*rad*) genes in meiotic recombination in yeast. *Genetics* **9**:51-68.
849. Game J. C. 2000. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. *Mutat Res.* **451**(1-2):277-293.
850. Naor A. and Gophna U. 2013. Cell fusion and hybrids in Archaea: prospects for genome shuffling and accelerated strain development for biotechnology. *Bioengineered.* **4**(3):126-129.
851. Шуколюков Ю.А. 1980. Уран. Природный ядерный реактор. *Химия и Жизнь* №26, 1980:20-24.
852. Ringel R., Sologub M., Morozov YI., Litonin D., Cramer P. and Temiakov D. 2011. Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* **78**(7368):269-273.
853. Lee Y.-S., Kennedy W.D., and Yin Y.W. 2009. Structural insights into human mitochondrial DNA replication and disease-related polymerase mutations. *Cell* **139**(2):312-324.
854. Wichterman R. 1986. *The Biology of Paramecium. Second Edition*. Plenum Press, New York.
855. Sugai T, Hiwatashi K. 1974. Cytologic and autoradiographic studies of the micronucleus at meiotic

- prophase in *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool* 1974, **21**:542-548.
856. Martindale D.W., Allis C.D., Bruns P.J. 1985. RNA and protein synthesis during meiotic prophase In *Tetrahymena thermophila*. *J Protozool* 1985, **32**:644-649.
857. Chalker DL, Yao MC. 2001. Nongenic, bidirectional transcription precedes and may promote Developmental DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev*, 15:1287-1298.
858. Mochizuki K. 2010. DNA rearrangements directed by non-coding RNAs in ciliates. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **1**(3):376-387.
859. Harper D.S., Song K. and Jahn C.L. 1991. Overamplification of macronuclear linear DNA molecules during prolonged vegetative growth of *Oxytricha nova*. *Gene*. **99**(1):55-61.
860. Hoffman D.C. and Prescott D.M. 1997. Phylogenetic relationships among Hypotrichous ciliates determined with the macronuclear gene encoding the large catalytic subunit of DNA polymerase α . *Journal of Molecular Evolution* **5**(3):301-310.
861. Meister G. 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* **14**:447- 459.
862. Clark M. B., Choudhary A., Smith M. A., Taft R.J. and Mattick J.S. 2013. The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs. *Essays Biochem*. **54**:1-16.
863. Portnoy V., Huang V., Place R. F. and Li L.-C. 2011. Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **2**(5):748-760.
863. Joshua-Tor L. and Hannon G.J. 2011. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **3**(10):a003772.
864. Slotkin R. K. and Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics* **8**, 272-285.
865. Siomi M. C., Sato K., Pezic D. and Aravin A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**:246-258.
866. Malone C. D. and Hannon G.J. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**(4):656-668.
867. Matranga, Ch. and . Zamore Ph. D. 2007. Small silencing RNAs. *Current Biology* 17(18): R789-R793.
868. Vagin V. V., Sigova A., Li Ch., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. 2006. A distinct small RNA Pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* **313**:320-324.
869. Cerutti H. and Casas-Mollano J. 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*. **50**(2):81-99.
870. Swarts D. C., Jore M. M., Westra E. R., Zhu Y., Janssen J. H., Snijders A. P., Wang Y., Patel D. J., Berenguer J., Brouns S. J. J., and van der Oos J. 2014. DNA-guided DNA interference by a Prokaryotic Argonaute. *Nature* **507**(7491): 258-261.
871. Zander A., Holzmeister P., Klose D., Tinnefeld P. and Grohmann D. 2014. Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biology* **11**(1):45-56.
872. Olovnikov I., Chan K., Sachidanandam R., Newman D.K. and Aravin A. A. 2013. Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell*. 51(5):
873. Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E.V. , Patel D.J. and van der Oost, J. 2014. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **21**:743-753.
874. Kapitonov, V. V. and Jurka, J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(15):8714-8719.
875. Pritham E.J., Putliwala T., Feschotte C. 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* **390**(1-2):3-17.
875. Hua-Van A., Le Rouzic A., Boutin T.S., Filée J. and Capy P. 2011. The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct* 2011, 6:19.
876. Feschotte C. and Pritham E.J. 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*. **41**: 331-368.
877. Doolittle W, Sapienza C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* **284**(5757):601-603.
878. Orgel L.E., Crick F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284**: 604-607.
879. Brosius J. 1999. Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. *Genetica*. **107**(1-3):209-238.
880. Silvs J. C., Shabalina S. A., Harris D. G., Spouge J. L. and Kondrashov A. S. 2003. Conserved fragments of transposable elements in intergenic regions: evidence for widespread recruitment of

- MIR- and L2-derived sequences within the mouse and human genomes. *Genetical research* **82**(1):1-18.
881. Klenov M.S., Sokolova O.A., Yakushev E.Y., Stolyarenko A.D., Mikhaleva E.A., Lavrov S.A., and Gvozdev V.A. 2011. Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(46):18760-18765.
882. Gross L. 2006. Transposon silencing keeps jumping genes in their place. *PLoS Biol.* 4(10): e353.
883. Senti K.A., Brennecke J. 2010. The piRNA pathway: a fly's perspective on the guardian of the genome. *Trends Genet.* **26**(12):499-509.
884. Obbard D.J., Gordon K. H. J., Buck A. H. and Jiggins F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**: 99-115.
885. Shabalina S.A. and Koonin Eu. V. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol.* **23**(10): 578-587.
886. Mignone F. , Gissi C., Liuni S. and Pesole G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **3**(3):reviews 0004.1–0004.10
887. Nekrutenko A. and Li, W-H. 2001. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet.* **17**:619-621.
888. Jordan I.K., Rogozin I.B., Glazko G.V. and Koonin EV. 2003. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet.* **19**(2):68-72.
889. Landry J.R., Medstrand P. and Mager D.L. 2001. Repetitive elements in the 5' untranslated region of a human zinc-finger gene modulate transcription and translation efficiency. *Genomics* **76**(1-3):110-116.
890. Davis M.B., Dietz J., Standiford D.M. and Emerson C.P. Jr.1998. Transposable element insertions respecify alternative exon splicing in three *Drosophila* myosin heavy chain mutants. *Genetics* **150**(3):1105-1114.
891. Sorek R., Ast G. and Graur D. 2002. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res.* **12**(7):1060-1067.
892. Lev-Maor G., Sorek R., Shomron N. and Ast G. 2003. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science.* **300**(5623):1288-1291.
893. Bejerano G., Lowe C. B., Ahituv N., King B., Siepel A., Salama S. R., Rubin E. M., Kent W. J. and Haussler D. 2006. A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. *Nature* **441**:87-90.
894. Sinzelle L., Izsvák Z. and Ivics Z. 2009. Molecular domestication of transposable elements: From detrimental parasites to useful host genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(6):1073-1093.
895. Pardue, Mary-Lou and DeBaryshe P. G. 2008. *Drosophila* telomeres: A variation on the telomerase theme. *Fly* **2**(3):101-110.
896. Barsoum E., Martinez P. and Aström S.U. Alpha3, a transposable element that promotes host sexual reproduction. 2010. *Genes Dev.* **24**(1):33-44.
897. Reddy KC, Villeneuve AM (2004) *C. elegans* HIM-17 links chromatin modification and competence for initiation of meiotic recombination. *Cell* **118**:439-452.
898. Fukagawa T. and Earnshaw W.C. 2014. The centromere: Chromatin foundation for the kinetochore machinery. *Developmental Cell* 30(5):496-508.
899. Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**:1833-1837.
900. Reinhart B.J. and Bartel D. P. 2002. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science.* **297**(5588):1831.
901. Dawe R. K.2003. RNA interference, transposons, and the centromere. *The Plant Cell*, **15**:297-301.
902. Masumoto H., Nakano M. and Ohzeki J. 2004. The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosome Res.* 12(6):543-56.
903. Okada T., Ohzeki J., Nakano M., Yoda K., Brinkley W.R., Larionov V. , and Masumoto H. 2007. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell.* **131**(7):1287-300.
904. Mateo L. and González J. 2014. Pogo-like transposases have been repeatedly domesticated into CENP-B-related proteins. *Genome Biol Evol*, **6**(8):2008-2016.
905. Lorenz D.R., Mikheyeva I.V., Johansen P., Meyer L., Berg A., Grewal S.I.S., and Cama H.P. 2012. CENP-B cooperates with Set1 in bidirectional transcriptional silencing and genome organization of retrotransposons. *Molecular and Cellular Biology* **32**(20):4215–4225.

906. Tudor M., Lobočka M., Goodell M., Pettitt J. , and O'Hare K. 1992. The pogo transposable element family of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* **232**(1):126-34.
907. Smit A.F. and Riggs A.D. 1996. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(4):1443-1448.
908. Casola C., Hucks D., and Feschotte C. 2008. Convergent domestication of *pogo*-like transposases into centromere-binding proteins in fission yeast and mammals. *Mol Biol Evol.* **25**(1): 29–41.
909. Bestor T. H., Edwards J.R. and Boulard M. 2015. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **112**(22):6796-6799.
910. Probst A.V., Dunleavy E. and Almouzni G. 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**(3):192-206.
911. Rose N.R. and Klose R.J. 2014. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* **1839**(12):1362-1372.
912. Yi S. 2012. Birds do it, bees do it, worms and ciliates do it too: DNA methylation from unexpected corners of the tree of life. *Genome Biology* **13**:174.
913. He X.-J., Chen T. and Zhu J.-K. 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research* **21**:442-465.
914. Pikaard C.S. and Scheid O. M. 2014. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;**6**:a019315.
915. Sui X., Kong N., Wang Z. and Pan H. 2013. Epigenetic regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene: A potential therapeutic target for the treatment of leukemia (Review). *Oncol Lett.* **6**(2):317-322.
916. Fachinetti D., Folco H. D., Nechemia-Arbely Y., Valente L. P., Nguyen K., Wong A. J., Zhu Q., Holland A. J., Desai A., Jansen L. E. T. and Cleveland D. W. 2013. A two-step mechanism for epigenetic specification of centromere identity and function. *Nature Cell Biology* **15**:1056–1066.
917. MacDonald W.A. 2012. Epigenetic mechanisms of genomic imprinting: Common themes in the regulation of imprinted regions in mammals, plants, and insects. *Genetics Research International* **2012**, Article ID 585024, 17 pages.
918. Mette, M. F. , Aufsatz, W. , van der Winden, J. , Matzke, M. A. and Matzke, A. J. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**, 5194–5201.
919. Kawasaki H. and Taira K. 2004. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* **431**:211-217 .
920. Matzke M.A. and Mosher R.A. 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**:394-408.
921. Sasaki T., Kobayashi A., Saze H. and Kakutani T. 2012. RNAi-independent *de novo* DNA methylation revealed in *Arabidopsis* mutants of chromatin remodeling gene DDM1. *Plant J.* **70**(5):750-758.
922. Martienssen R.A., Kloc A., Slotkin R.K. and Tanurdzić M. 2008. Epigenetic inheritance and reprogramming in plants and fission yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **73**:265-271.
923. Finnegan E.J. and Dennis E.S. 2007. Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr Biol.* **17**(22):1978-1983.
924. Chow C.M., Georgiou A., Szutorisz H., Maia e Silva A., Pombo A., Barahona I., Dargelos E., Canzonetta C. and Dillon N. 2005. Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep.* **6**(4):354-360.
925. Gonzalez M. and Li F. 2012. DNA replication, RNAi and epigenetic inheritance. *Epigenetics.* **7**(1):14-9.
926. Rice J.C., Nishioka K., Sarma K., Steward R., Reinberg D. and Allis C.D. 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* **16**(17):2225-2230.
927. Budhavarapu V.N., Chavez M. and Tyler J.K. 2013. How is epigenetic information maintained through DNA replication? *Epigenetics & Chromatin* 2013, 6:32.
928. Law J.A. and Jacobsen S.E. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **11**, 204-220.
929. Nashun B., Hill P. W.S. and Hajkova P. 2015. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J.* **34**(10):1296-308.

930. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. 2014. Messerschmidt D.M., Knowles B.B., and Solter D. *Genes & Dev.* **28**:812-828.
931. Oakes C.C. La Salle S., Smiraglia D.J., Robaire B. and Trasler J.M. 2007. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol.* **307**(2):368-79.
932. Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A. and Meissner A. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature.* 484(7394):339-344.
933. Kawasaki Y., Lee J., Matsuzawa A., Kohda T., Kaneko-Ishino T. and Ishino, F. 2014. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Scientific Reports* **4**, Article number: 3658.
934. Yamaguchi S., Shen L., Liu Y., Sandler D. and Zhang Y. 2013. Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature* **504**(7480):460-464.
935. Hackett J.A., Sengupta R., Zylitz J.J., Murakami K., Lee C., Down T.A. and Surani M.A. 2013. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* **339**(6118):448-452.
936. Reis e Silva A.R., Bruno C., Fleuret R., Daniel N., Archilla C., Peynot N, Lucci C.M., Beaujean N. and Duranthon V. 2012. Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. *Epigenetics* **7**:440-446.
937. Salilew-Wondim D., Fournier E., Hoelker M., Saeed-Zidane M., Tholen E., Looft C., Neuhoff C., Besenfelder U., Havlicek V., Rings F., Gagné D., Sirard M.A., Robert C., A Shojaei Saadi H., Gad A., Schellander K. and Tesfaye D. 2015. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. *PLoS One* **10**(11):e0140467.
938. Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E. and Reik W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *PNAS* **98**:13734-13738.
939. Dobbs K.B., Rodriguez M., Sudano M.J., Ortega M.S. and Hansen P.J. 2013. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* **8**:e66230.
940. Beaujean N., Hartshorne G., Cavilla J., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L. 2004. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*, **14**(7):R266-R267.
941. Shi W., Dirim F., Wolf E., Zakhartchenko V., Haaf T. 2004. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vivo fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol Reprod*, **71**:340-347.
942. Hou J., Lei T.H., Liu L., Cui X.H., An X.R., Chen Y.F. 2005. DNA methylation patterns in in vitro -fertilised goat zygotes. *Reprod Fert Dev*, **17**:809-813.
943. Smith Z.D., Chan M.M., Humm K.C., Karnik R., Mekhoubad S., Regev A., Eggan K. and Meissner A. 2014. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* **511**:611–615.
944. Zhang H. and Zhu J.-K. 2012. Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **77**:161-173.
945. Jiang L., Zhang J., Wang J.J., Zhang L., Li G., Yang X., Ma X., Sun X., Cai J., Zhang J., Huang X., Yu M., Wang X., Liu F., Wu C.I., He C., Zhang B., Ci W. and Liu J. 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* **153**:773-784.
946. Potok M.E., Nix D.A., Parnell T.J. and Cairns B.R. 2013. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell* **153**:759-772.
947. MacDonald W.A. 2012. Epigenetic mechanisms of genomic imprinting: Common themes in the regulation of imprinted regions in mammals, plants, and insects. *Genetics Research International* **2012**, Article ID 585024, 17 pages.
948. Cha M., Wang H., Chung D., Bennetzen J.L. and Westpheling J. 2013. Isolation and bioinformatic analysis of a novel transposable element, ISCbe4, from the hyperthermophilic bacterium, *Caldicellulosiruptor bescii*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **40**(12):1443-1448.
949. Muñoz-López M. and García-Pérez J.L. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics.* **11**(2):115-128.
950. Bétermier M, Duhaucourt S, Seitz H, Meyer E. 2000. Timing of developmentally programmed

- excision and circularization of *Paramecium* internal eliminated sequences. *Mol Cell Biol* 20(5):1553-1561.
951. Fass J.N., Joshi N.A., Couvillion M.T., Bowen J., Gorovsky M.A., Hamilton E.P., Orias E., Hong R., Coyne R.S., Eisen J.A., Chalker D.L., Lin D. and Collins K. 2011. Genome-scale analysis of programmed DNA elimination sites in *Tetrahymena thermophila*. G3 (Bethesda). **1**(6):515-522.
 952. Arnaiz O., Mathy N., Baudry C., Malinsky S., Aury J.M., Denby Wilkes C., Garnier O., Labadie K., Lauderdale B.E., Le Mouél A., Marmignon A., Nowacki M., Poulain J., Prajer M., Wincker P., Meyer E., Duhaucourt S., Duret L., Bétermier M. and Sperling L. 2012. The *Paramecium* germline genome provides a niche for intragenic parasitic DNA: evolutionary dynamics of internal eliminated sequences. *PLoS Genet.* **8**(10):e1002984.
 953. Hunter D.J., Williams K., Cartinhour S. and Herrick G. 1989. Precise excision of telomere-bearing transposons during *Oxytricha fallax* macronuclear development. *Genes Dev* **3**:2101-2112.
 954. Nowacki M., Higgins B.P., Maquilan G.M., Swart E.C. Doak T.G. and Landweber L.F. 2009. A functional role for transposases in a large eukaryotic genome. *Science* **324**:935-938.
 955. Baudry, C., Malinsky, S., Restituito, M., Kapusta, A., Rosa, S., Meyer, E., and Bétermier, M. 2009. PiggyMac, a domesticated piggyBac transposases involved in programmed genome rearrangements in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev.* **23**:2478-2483.
 956. Cheng C.Y., Vogt A., Mochizuki K. and Yao M.C. 2010. A domesticated piggyBac transposase plays key roles in heterochromatin dynamics and DNA cleavage during programmed DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Biol. Cell* 21:1753-1762.
 957. Fang W., Wang X., Bracht J.R., Nowacki M. and Landweber L.F. 2012. Piwi-interacting RNAs protect DNA against loss during *Oxytricha* genome rearrangement. *Cell* **151**:1243-1255.
 958. Kataoka, K., and Mochizuki, K. 2011. Programmed DNA elimination in *Tetrahymena*: a small RNA-mediated genome surveillance mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **722**:156-173.
 959. Schoeberl, U.E., Kurth, H.M., Noto, T., and Mochizuki, K. 2012. Biased transcription and selective degradation of small RNAs shape the pattern of DNA elimination in *Tetrahymena*. *Genes Dev.* **26**:1729-1742.
 960. Bracht, J.R., Perlman, D.H., and Landweber, L.F. 2012. Cytosine methylation and hydroxymethylation mark DNA for elimination in *Oxytricha trifallax*. *Genome Biol.* **13**, R99.
 961. Sandoval P.Y., Swart E.C., Arambasic M. and Nowacki M. 2014. Functional diversification of Dicer-like proteins and small RNAs required for genome sculpting. *Dev Cell.* **28**(2):174-188.
 962. Dupraz A. M. P., de Wijn J. R., van der Meer S. A. T., and de Groot K. 1996. Characterization of silane-treated hydroxyapatite powders for use as filler in biodegradable composites. *J. Biomed. Mater. Res.*,**30**:231-238.
 963. Vasiliev A.N., Zlotnikov E., Khinast J.G. and Riman R.E. 2008. Chemisorption of silane compounds on hydroxyapatites of various morphologies. *Scr Mater* **58**(12):1039-1042.
 964. Mehta R., Lund J.A., and Parviz B.A. 2007. Molecular combing for stretching single-stranded phage genomes on conductive graphite surfaces. Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, January 16 - 19, 2007, Bangkok, Thailand.
 965. Kaykov A., Taillefumier T., Bensimon A. and Nurse P. 2016. Molecular combing of single DNA molecules on the 10 megabase scale. *Sci Rep.* 2016 Jan 19; 6:19636.
 966. Ferree S. and Blanch H.W. 2003. Electrokinetic stretching of tethered DNA. *Biophysical Journal* **85**:2539-2546.
 967. Janissen R., Berghuis B. A., Dulin D., Wink M., van Laar Th. and Dekker N.H. 2014. Invincible DNA tethers: covalent DNA anchoring for enhanced temporal and force stability in magnetic tweezers experiments. *Nucleic Acids Research* **42**(18) e137.
 968. Perkins Th. T., Smith D. E., Larson R.G. and Chu S. 1995. Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow. *Science*, **268**(5207):83-87.
 969. Woolley A.T. and Kelly R.T. 2001. Deposition and characterization of extended single-stranded DNA molecules on surfaces. *Nano Letters*, **1**(7):345-348.
 970. Michalet X. 2001. Stretching single-stranded DNA on a surface. *Nano Letters*, **1**(7):341-343.
 971. Netzer L. and Sagiv J. 1983. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**(3):674-676.

