

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.06.01 Основы регуляции
метаболизма микроорганизмов

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 «Общая характеристика метаболизма бактерий, особенности их биоэнергетики».....	3
1.2 Лекция № 2 «Регуляция активности ферментов у микроорганизмов».....	11
1.3 Лекция № 3 «Регуляция синтеза ферментов у микроорганизмов».....	15
1.4 Лекция № 4 «Регуляция аэробного дыхания у микроорганизмов».....	18
1.5 Лекция №5 «Регуляция процессов брожения. Химизм и практическое использование».....	21
1.6 Лекция №6 «Регуляция синтеза ДНК».....	25
1.7 Лекция №7 «Регуляция клеточной дифференцировки и клеточного цикла у микроорганизмов».....	30
1.8 Лекция №8 «Регуляция хемотаксиса. Цитоплазматические сигнальные белки».....	34
1.9 Лекция №9 «Оперонная и регулонная организация генов».....	38
1.10 Лекция №10 «Регуляция метаболизма у эукариот».....	40
 2. Методические материалы по проведению практических занятий	 44
2.1 Практическое занятие № ПЗ-1 «Характеристика конструктивного метаболизма».....	44
2.2 Практическое занятие № ПЗ-2 «Регуляция вторичного метаболизма. Регуляция синтеза АТФ у микроорганизмов».....	47
2.3 Практическое занятие № ПЗ-3 «Регуляция синтеза ферментов у микроорганизмов».....	49
2.4 Практическое занятие № ПЗ-4 «Регуляция аэробного дыхания у микроорганизмов».....	53
2.5 Практическое занятие № ПЗ-5 «Регуляция анаэробного дыхания у микроорганизмов».....	54
2.6 Практическое занятие № ПЗ-6 «Регуляция процессов брожения».....	55
2.7 Практическое занятие № ПЗ-7 «Регуляция клеточной дифференцировки и клеточного цикла у микроорганизмов».....	55
2.8 Практическое занятие № ПЗ-8 «Регуляция клеточной подвижности у микроорганизмов».....	57
2.9 Практическое занятие № ПЗ-9 «Регуляция хемотаксиса. Цитоплазматические сигнальные белки».....	57

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Общая характеристика метаболизма бактерий, особенности их биоэнергетики».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Понятие о метаболизме у бактерий.
2. Общая характеристика энергетического метаболизма
3. Источники энергии у микроорганизмов
4. Пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Понятие о метаболизме у бактерий

Метаболизм – это совокупность биохимических процессов, протекающих в клетке и обеспечивающих ее жизнедеятельность. Клеточный метаболизм складывается из двух противоположно направленных процессов: энергетического метаболизма и конструктивного метаболизма. Промежуточные или конечные продукты, образующиеся в соответствующей последовательности ферментативных реакций, в результате которой разрушается или синтезируется ковалентно связанный скелет конкретной биомолекулы, называют **метаболитами**.

Энергетический метаболизм (катаболизм) – это совокупность реакций окисления различных восстановленных органических и неорганических соединений, сопровождающихся выделением энергии, аккумулируемой клеткой в форме фосфатных связей.

Конструктивный метаболизм (анаболизм) – это совокупность реакций биосинтеза, в результате которых за счет веществ, поступающих извне, и промежуточных продуктов (амфиболитов), образующихся при катаболизме, синтезируется вещество клеток. Этот процесс связан с потреблением свободной энергии, запасенной в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях.

Конструктивный и энергетический метаболизм состоит из ряда последовательных ферментативных реакций, протекание которых условно можно представить следующим образом.

На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы химических веществ, которые служат исходными субстратами для метаболизма обоих типов. Иногда эту часть метаболического пути называют **периферическим метаболизмом**, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, – периферическими. Последующие превращения включают ряд ферментативных реакций и приводят к синтезу промежуточных продуктов (**промежуточный метаболизм**). Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей используются для построения вещества клеток, а энергетических путей – выделяются в окружающую среду. Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. В процессе анаболизма синтезируются многочисленные ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме. С другой стороны, в реакциях катаболизма образуется не только энергия для биосинтетических целей, но и многие промежуточные продукты, которые необходимы для синтеза веществ, входящих в состав клеточных структур.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом того, что бактерии в качестве источников энергии и углерода могут использовать самый широкий набор органических и

неорганических соединений. Соответственно, можно выделить различные типы энергетического и конструктивного обмена микроорганизмов (табл. 1)

Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных *экзоферментов*, относящихся к классу гидролаз, которые выделяются наружу и разрушают макромолекулы исходных субстратов до веществ с низкой молекулярной массой. Образующиеся в результате действия таких ферментов вещества поступают в клетку бактерий и подвергаются действию *эндоферментов*. Многие из эндоферментов локализованы на мембранах или на рибосомах, в таком состоянии они называются связанными ферментами. Другие ферменты находятся в свободном, растворенном состоянии в цитоплазме.

Таблица 1 - Типы энергетического и конструктивного обмена микроорганизмов

Источник энергии	Доноры электронов	Источники углерода	
		органические вещества	углекислота
свет	органические	фотоорганогетеротрофия	фотоорганогетеротрофия
свет	неорганические	фотолитогетеротрофия	фотолитоавтотрофия
органические вещества	органические	хемоорганогетеротрофия	хемоорганогетеротрофия
неорганические вещества	неорганические	хемолитогетеротрофия	хемолитоавтотрофия

Набор ферментов в клетке может изменяться в зависимости от условий, в которых обитают бактерии, соответственно все ферменты подразделяют на две группы: конститутивные и индуцибельные. **Конститутивные ферменты** синтезируются постоянно, независимо от наличия веществ-субстратов. В клетке они обнаруживаются в более или менее постоянных концентрациях. Примером конститутивного фермента является ДНК-полимераза. **Индукцибельные ферменты** синтезируются в ответ на появление в среде субстрата-индуктора. К ним относится большинство гидролаз. Способность к индукции синтеза таких ферментов обеспечивает быструю приспособляемость бактерий к конкретным условиям.

Назначение метаболизма состоит в следующем: 1) генерация энергии в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях; 2) образование субъединиц, из которых синтезируются макромолекулы основных биополимеров клетки; 3) активация образованных субъединиц за счет переноса фосфатной группы с АТФ, происходящая с затратой энергии. Этот процесс необходим, поскольку только активированные субъединицы способны вступать в реакции полимеризации; 4) синтез специфических макромолекул из активированных субъединиц, т. е. их полимеризация. Полимеризация активированных субъединиц может происходить: а) в реакциях матричного синтеза; б) за счет простой конденсации одинаковых активированных субъединиц.

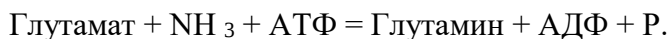
2. Наименование вопроса №2. **Общая характеристика энергетического метаболизма.**

По отношению к энергетическим источникам все микроорганизмы подразделяются на две группы: хемотрофные и фототрофные. Хемотрофные микроорганизмы используют для синтеза молекул АТФ энергию, освобождаемую в результате химических реакций, фототрофные – световую энергию в процессе протекания фотосинтеза.

АТФ – универсальный переносчик химической энергии между реакциями, доставляющими энергию, и реакциями, потребляющими ее (это вещество называют «энергетической валютой клетки»). В форме АТФ энергия, полученная в результате фотосинтеза, дыхания или брожения, становится доступной для клетки и может быть ею использована.

Основные функции АТФ:

- Является непосредственным источником энергии для таких разнообразных процессов, как синтез структурных компонентов макромолекул, механическое движение и осморегуляция.
- Служит для переноса высокоэнергетических фосфатных групп и является связующим звеном между процессами, сопровождающимися выделением энергии, и процессами, протекающими с потреблением энергии. АДФ и АМФ, образующиеся в результате дефосфорилирования АТФ, вновь фосфорилируются до АТФ в процессе дыхания. Пара АТФ-АДФ служит в клетке главной системой переноса фосфата. Однако для переноса или распределения энергии фосфатной связи в реакциях биосинтеза используются также и другие нуклеозидфосфаты.
- За счет АТФ промежуточные продукты клеточного метаболизма активируются для дальнейших реакций, к которым относятся реакции конденсации, восстановления и расщепления. Например, глутамин может синтезироваться из глутамата и аммиака, только если образуется фосфорилированный промежуточный продукт:



К соединениям, обладающим макроэргическими связями, кроме АТФ, относятся также другие нуклеозидфосфаты (УТФ (урацилтрифосфат), ЦТФ (цитозин), ГТФ, ТТФ), фосфоенолпируват и некоторые другие соединения. Они также могут служить переносчиками высокоэнергетических фосфатных групп, которые они поставляют для специфических реакций биосинтеза при участии фермента нуклеозидфосфокиназы. Однако образование этих макроэргических соединений в большинстве случаев зависит от энергии, поставляемой АТФ.

Выделены два класса фосфорилированных соединений, которые имеют большую отрицательную величину стандартной свободной энергии гидролиза, чем у АТФ:

1) Соединения, образующиеся в процессе ферментативного расщепления молекул биологического «топлива». Из наиболее важных представителей можно назвать два: 1,3-дифосфоглицерат и фосфоенолпируват. Оба они образуются при анаэробном сбраживании глюкозы.

2) Соединения, играющие роль «аккумуляторов» энергии, т.е. сохраняющие ее в форме энергии фосфатных связей. Часто такие соединения называют *фосфагенами* (к ним относятся, например, креатинфосфат, аргининфосфат и полиметафосфат).

Важно подчеркнуть, что связь между высоко- и низкоэнергетическими фосфорилированными соединениями осуществляется системой АТФ – АДФ. Фосфатные группы переносятся при участии специфических фосфотрансфераз от высокоэнергетических соединений к АДФ. АТФ, образующийся в такой реакции, выступает затем как специфичный донор фосфата в другой ферментативной реакции, продуктом которой является низкоэнергетическое фосфорилированное соединение.

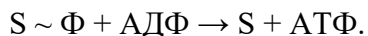
Синтез АТФ осуществляется в основном с помощью трех процессов: 1) фотосинтетического фосфорилирования; 2) окислительного фосфорилирования (фосфорилирование в дыхательной цепи); 3) субстратного фосфорилирования.

Два первых процесса сходны между собой в том, что АТФ образуется в них при участии АТФ-синтазы.

Окислительное фосфорилирование (фосфорилирование при переносе электронов) представляет механизм, в котором поток электронов от доноров с отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом к акцепторам с более положительным потенциалом сопряжен с синтезом АТФ из АДФ и Р. Системами, в которых происходит фосфорилирование при переносе электронов, являются дыхательные цепи и фотосинтетический аппарат. Этот процесс у прокариот связан с мембранами или их производными, поэтому его называют *мембранным фосфорилированием*. Синтез АТФ в данном случае происходит при участии фермента АТФ-синтазы:



Субстратное фосфорилирование может происходить при различных реакциях промежуточного метаболизма. При этом фосфатная группа переносится на АДФ от вещества (субстрата), более богатого энергией, чем АТФ:



В клетке реакции субстратного фосфорилирования не связаны с мембранными структурами и катализируются растворимыми ферментами промежуточного метаболизма. Донором активированной фосфорильной группы, необходимой для регенерации АТФ, являются интермедианты процессов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Во всех этих случаях окислительные процессы приводят к образованию высокоэнергетических соединений: 1,3-дифосфоглицерата (гликолиз), сукцинил-КоА (цикл трикарбоновых кислот), которые при участии соответствующих ферментов способны фосфорилировать АДФ и образовывать АТФ.

У хемотрофных бактерий генерация энергии в молекулах АТФ сводится к двум типам биохимических реакций: окисления и восстановления. Окисляться микроорганизмами могут самые разнообразные органические и неорганические вещества, являющиеся донорами электронов. Поскольку электроны не могут самостоятельно существовать, они обязательно должны быть перенесены на молекулы, способные их воспринимать. Такие молекулы называются акцепторами электронов. Донором электронов не может быть предельно окисленное вещество, а их акцептором – предельно восстановленное. Т.о., должен существовать внешний энергетический ресурс – исходный субстрат. С помощью ферментных систем организм извлекает энергию из этого субстрата в реакциях его ступенчатого окисления, приводящего к освобождению энергии небольшими порциями. При биологическом окислении чаще всего происходит одновременный перенос двух электронов; при этом от субстрата отщепляются также два протона (H^+). Такое окисление субстрата, происходящее с отщеплением двух протонов и двух электронов, называется

дегидрированием. Поэтому нередко термины «донор водорода» и «донор электронов» употребляются как синонимы, равнозначны и такие термины, как акцептор водорода и акцептор электронов; окисление и дегидрирование; восстановление и гидрирование. Все окислительно-восстановительные реакции энергетического метаболизма у **хемотрофных микроорганизмов** можно разделить на три типа: 1) аэробное дыхание, или аэробное окисление; 2) анаэробное дыхание; 3) брожение.

Аэробное дыхание – это основной процесс энергетического метаболизма многих прокариот, при котором донором водорода или электронов являются органические (реже неорганические) вещества, а конечным акцептором – молекулярный кислород. Основное количество энергии при аэробном дыхании образуется в электронтранспортной цепи, т. е. в результате **окислительного (мембранного) фосфорилирования**. Необходимо помнить, что часто бактерии не до конца (углекислый газ и вода) окисляют органические соединения.

Анаэробное дыхание – цепь анаэробных окислительно- восстановительных реакций, которые сводятся к окислению органического или неорганического субстрата с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а других неорганических веществ (нитрата NO_3^- , нитрита – NO_2^- , сульфата – SO_4^{2-} , сульфита – SO_3^{2-} , CO_2 и др.), а также органических веществ (фумарата и др.). Молекулы АТФ в процессе анаэробного дыхания образуются в основном в электронтранспортной цепи, т. е. в результате реакций **мембранного фосфорилирования**, но в меньшем количестве, чем при аэробном дыхании.

Брожение– совокупность анаэробных окислительно-восстановительных реакций, при которых органические соединения служат как донорами, так и акцепторами электронов. Как правило, доноры и акцепторы электронов образуются из одного и того же субстрата, подвергающегося брожению (например, из углевода). Сбраживанию могут подвергаться различные субстраты, но лучше других используются углеводы. АТФ при брожении синтезируется в результате реакций **субстратного фосфорилирования**.

Наиболее выгодным типом окислительно-восстановительных реакций у бактерий, в результате которых генерируется наибольший запас энергии в виде молекул АТФ, является аэробное дыхание. Наименее выгодным типом энергодающих реакций является брожение, сопровождающееся минимальным выходом АТФ.

У *фототрофных прокариот* имеется еще один способ получения энергии: фотосинтез. Известно три типа фотосинтеза: 1 – зависимый от бактериохлорофилла бескислородный фотосинтез, 2- зависимый от хлорофилла кислородный фотосинтез, 3 – зависимый от бактериородопсина бескислородный фотосинтез. В основе фотосинтеза 1 и 2 типа лежит поглощение солнечной энергии различными пигментами. Они приводят к разделению электрических зарядов, возникновению восстановителя с низким и окислителя с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Перенос электронов между этими двумя компонентами приводит к выделению свободной энергии. В фотосинтезе 3 типа окислительно-восстановительные переносчики отсутствуют. В этом случае энергия в доступной для организма форме возникает в результате светозависимого перемещения H^+ через мембрану.

3. Наименование вопроса №3. **Источники энергии у микроорганизмов**

Организмы могут использовать не все виды энергии, существующей в природе. Недоступными для них являются ядерная, механическая, тепловая виды энергии. Доступными для живых систем внешними источниками энергии являются электромагнитная энергия (свет определенной длины волны) и химическая (восстановленные химические соединения). Способностью использовать энергию света

обладает большая группа фотосинтезирующих организмов, в том числе и прокариот, имеющих фоторецепторные молекулы нескольких типов (хлорофиллы, каротиноиды и др.). Для всех остальных организмов источниками энергии служат процессы окисления химических соединений.

Часто энергетическими ресурсами служат биополимеры, находящиеся в окружающей среде (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты), а также липиды. Прежде чем быть использованными, биополимеры должны быть гидролизваны до составляющих их мономерных единиц. Этот этап весьма важен по следующим причинам. Белки и нуклеиновые кислоты отличаются исключительным разнообразием. Количество видов белков исчисляется тысячами, после гидролиза же образуется только 20 аминокислот. Все разнообразие нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) после гидролиза сводится к 5 видам нуклеотидов. Таким образом, расщепление полимеров до мономерных единиц резко сокращает набор химических молекул, которые могут быть использованы организмом.

Полимерные молекулы расщепляются до мономеров с помощью ферментов, синтезируемых и выделяемых прокариотами в окружающую среду (экзоферментов). Крахмал и гликоген гидролизуются амилазами, гликозидные связи целлюлозы расщепляются целлюлазой. Многие бактерии образуют пектиназу, хитиназу и другие ферменты, гидролизующие соответственные полисахариды и их производные. Белки расщепляются внеклеточными протеазами, действующими на пептидные связи. Нуклеиновые кислоты гидролизуются рибо- и дезоксирибонуклеазами. Образующиеся небольшие молекулы легко транспортируются в клетку через мембрану.

Процесс распада жирных кислот локализован в клетке и включает несколько этапов. На первом из них жирная кислота с помощью соответствующего фермента превращается в КоА-производное, которое окисляется с последующим отщеплением ацетил-КоА. Ацетил-КоА по катаболическим каналам используется для получения клеткой энергии. Процесс расщепления биополимеров не связан с образованием свободной, т.е. доступной клетке энергии. Происходящее при этом рассеивание энергии также невелико. Образовавшиеся мономеры подвергаются в клетке дальнейшим ферментативным превращениям, которые сводятся к тому, чтобы путем перестройки химической структуры получить молекулы, которые могли бы включиться на каком-то этапе в качестве метаболитов в функционирующие клеточные катаболические (энергетические) системы. Таких в прокариотической клетке несколько. Основные из них: гликолиз, окислительный пентозофосфатный путь, путь Энтнера-Дудорова и цикл трикарбоновых кислот. Общее для всех катаболических путей – многоступенчатость процесса окисления исходного субстрата. На некоторых этапах окисление субстрата сопряжено с образованием энергии в определенной форме, в которой эта энергия может использоваться в самых разнообразных энергозависимых процессах.

Таким образом, внешне доступные организмам источники энергии (свет, химические соединения) должны быть трансформированы в определенную форму, чтобы обеспечить внутриклеточные потребности в энергии.

4. Наименование вопроса №3. Пути катаболизма глюкозы (гексоз) у микроорганизмов

Поскольку большинство микроорганизмов в качестве источника энергии использует углеводы, и в первую очередь глюкозу, рассмотрим основные пути ее расщепления или катаболизма.

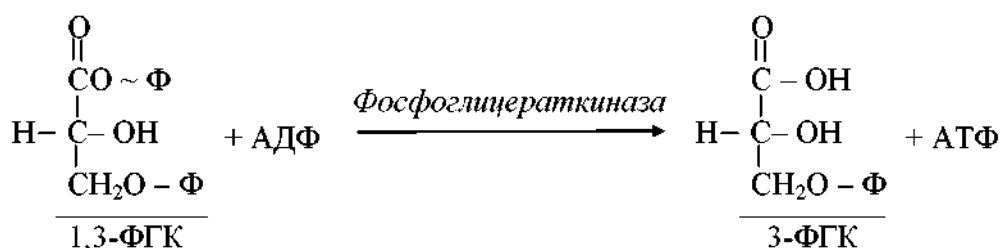
У бактерий возможны три пути катаболизма глюкозы:

- 1) гликолиз, или фруктозодифосфатный путь, или путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса;

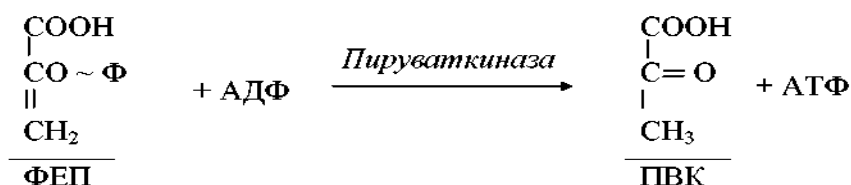
- 2) окислительный пентозофосфатный путь, или гексозомонофосфатный путь, или путь Варбурга – Диккенса – Хореккера;
- 3) 2-кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконатный путь (КДФГ-путь), или путь Энтнера – Дудорова.

Следует отметить, что все перечисленные пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов могут протекать при разных типах энергетического метаболизма (аэробное дыхание, анаэробное дыхание, брожение). Все пути катаболизма начинаются с того, что глюкоза, поступившая в клетку, сначала фосфорилируется при участии фермента гексокиназы и АТФ как донора фосфата. Образуется глюкозо-6-фосфат, который представляет метаболически активную форму глюкозы в клетке и служит исходным соединением для любого из трех путей катаболизма углеводов. Пути расщепления глюкозы состоят из многих биохимических реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом.

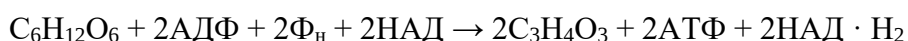
Наиболее распространенным путем катаболизма глюкозы у многих микроорганизмов является *гликолиз* (рис.1). При этом глюкозо-6-фосфат изомеризуется с помощью глюкозофосфатизомеразы и фосфорилируется далее в фруктозо-1,6-дифосфат, который затем расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон. Последний под действием фермента триозофосфатизомеразы превращается в 3-ФГА. Таким образом, из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы 3-ФГА. На эти реакции превращения глюкозы в 3-ФГА затрачивается энергия двух молекул АТФ. Далее происходит окисление каждой молекулы 3-ФГА до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК). 1,3-ФГК – высокоэнергетическое соединение, содержащее макроэргическую фосфатную связь; оно реагирует с АДФ (фермент фосфоглицераткиназа), отдавая высокоэнергетическую фосфатную группу, в результате чего синтезируется молекула АТФ. Таким образом, энергия, освободившаяся при окислении 3-ФГА, путем субстратного фосфорилирования оказывается аккумулированной в молекуле АТФ. Образуется 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК):



Далее 3-ФГК под действием фермента фосфоглицеромутаза превращается в 2-ФГК, из которой в результате отщепления воды образуется фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП). Это также высокоэнергетический фосфат, с которого богатая энергией фосфатная группа переносится пируваткиназой на АДФ, образуется молекула АТФ и пировиноградная кислота (ПВК). Это второе фосфорилирование на уровне субстрата:



Таким образом, при распаде одной молекулы глюкозы образуется четыре молекулы АТФ, в которых аккумулируется освободившаяся энергия. Поскольку в начале процесса на активирование глюкозы были затрачены две молекулы АТФ, чистый выход АТФ на одну молекулу глюкозы составляет две молекулы. Суммарное уравнение гликолиза можно записать следующим образом:



Пентозофосфатный путь расщепления углеводов характерен для некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также для гетероферментативных молочнокислых бактерий и некоторых маслянокислых бактерий. В этом цикле глюкозо-6-фосфат, образующийся путем активирования глюкозы молекулой АТФ, превращается через ряд промежуточных реакций в 6-фосфоглюконовую кислоту, которая подвергается окислению и декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата, CO_2 и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$. Рибулозо-5-фосфат включается в сложный цикл, приводящий к образованию из трех его молекул двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида. Глюкозо-6-фосфат может снова включаться в цикл, а 3-ФГА может быть превращен в пировиноградную кислоту.

С энергетической точки зрения этот путь катаболизма углеводов в 2 раза менее эффективен, чем гликолитический, так как при окислении одной молекулы глюкозы образуется только одна молекула АТФ. Однако большое значение этого пути в том, что он обеспечивает клетки бактерий пентозами (рибулозо-5-фосфатом), которые являются предшественниками нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, в этом цикле образуются две молекулы $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$, которые необходимы клетке для восстановительных реакций биосинтеза.

Путь Энтнера – Дудорова встречается у прокариот реже других. Он характерен в основном для псевдомонад и уксуснокислых бактерий. От пентозофосфатного пути он отличается тем, что 6-фосфоглюконовая кислота превращается в пировиноградную кислоту и 3-ФГА. Последний может превращаться в пировиноградную кислоту. Из одной молекулы глюкозы при функционировании этого пути синтезируется одна молекула АТФ, по одной молекуле $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$. Следует подчеркнуть, что путь Энтнера – Дудорова является самым кратчайшим механизмом расщепления углеводов до пировиноградной кислоты.

Сравнительная характеристика различных путей катаболизма глюкозы представлена на рис. 1. Рассмотрев пути катаболизма глюкозы, мы можем заключить, что важнейшим продуктом, образующимся в них, является пировиноградная кислота, которая подвергается дальнейшим превращениям. Пируват занимает центральное положение в метаболизме клеток и может служить предшественником многих продуктов.

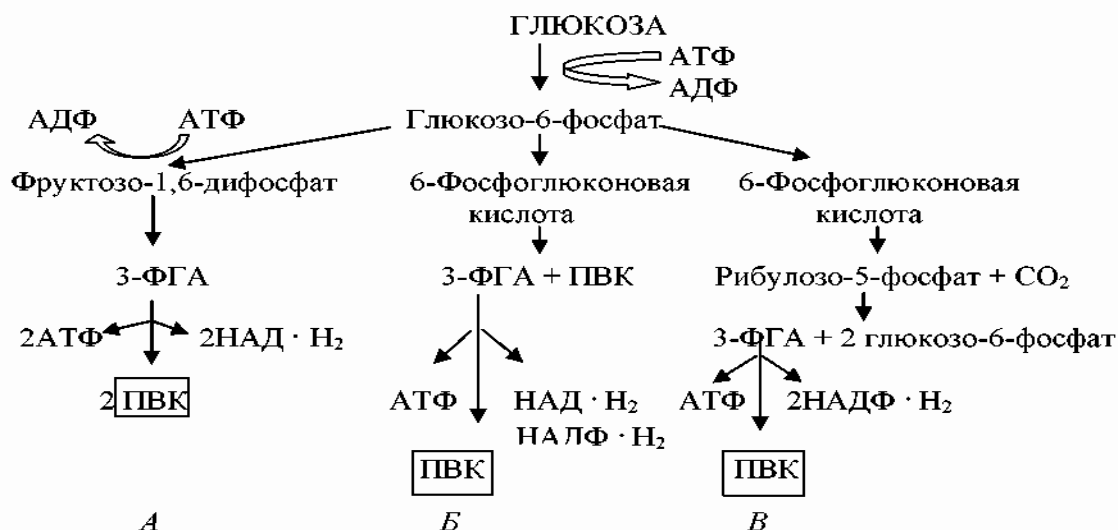


Рис. 32. Схема путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот: А – гликолиз; Б – путь Энтнера – Дудорова; В – пентозофосфатный путь

Рис. 1. Схема путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот: А – гликолиз; Б – путь Энтнера-Дудорова; В – пентозофосфатный путь

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Регуляция активности ферментов у микроорганизмов».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Регуляция активности ферментов
2. Регуляция синтеза ферментов у бактерий
3. Механизмы функционирования репрессибельных оперонов

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1. Регуляция активности ферментов

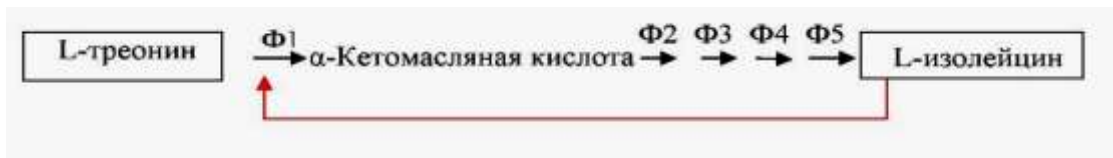
Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента. Этот процесс называется **ретроингибированием** или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза изолейцина (см. схему 1 и 2). Превращение L-треонина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций:



При накоплении в клетке L-изолейцина он связывается с аллостерическим центром фермента L-треониндезаминазы, подавляя его активность, и синтез L-изолейцина прекращается:



Молекула L-треониндезаминазы



В **разветвленных метаболических путях** активность аллостерических ферментов регулируется сложнее, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Ингибирование активности этого фермента может происходить двояко: в результате 1) мультивалентного либо 2) кумулятивного ингибирования.

- При **мультивалентном ингибировании** необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Каждый конечный продукт (эффе́ктор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента;

- При **кумулятивном, или аддитивном (=суммарном), ингибировании** присоединение к ферменту одного конечного продукта частично снижает его активность, с присоединением каждого последующего конечного продукта эффект ингибирования нарастает:

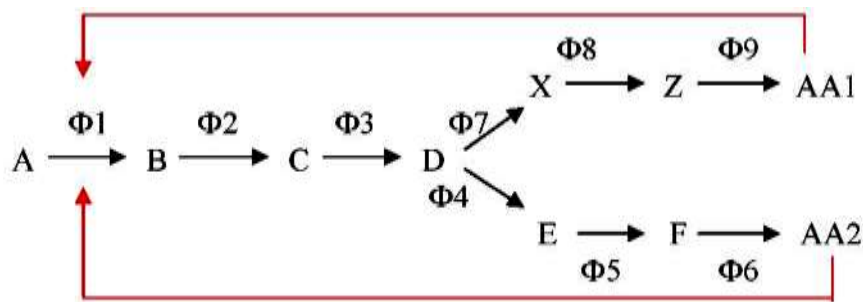


Схема мультивалентного либо кумулятивного ингибирования в разветвленных метаболических путях

В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента выполняется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, который образуется непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования получил название **последовательного** (рис. 4):

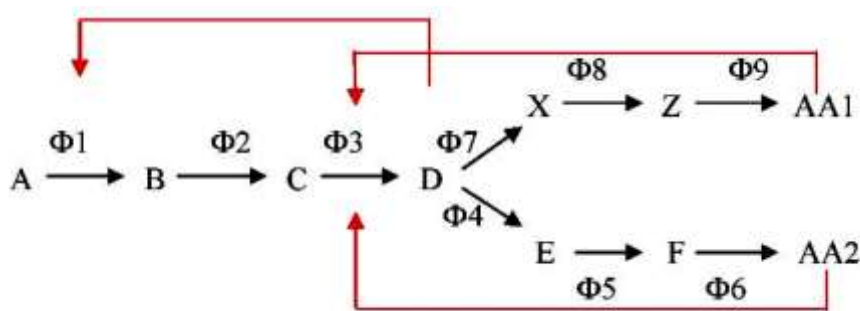
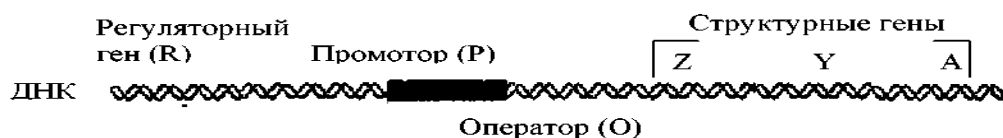


Схема последовательного ретроингибирования

2. Наименование вопроса №2. Регуляция синтеза ферментов у бактерий

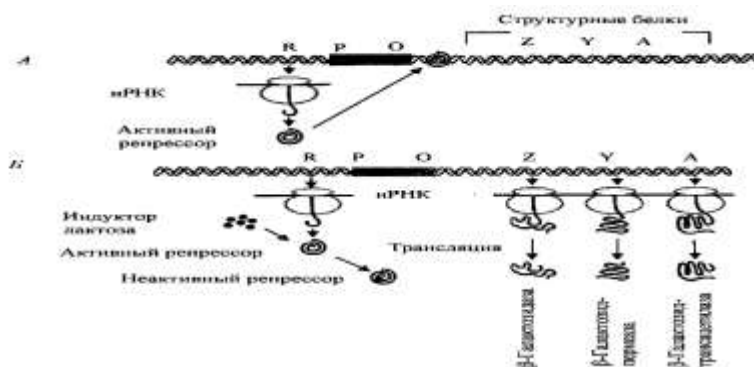
Оперон - это группа функционально связанных между собой генов. Промотор, оператор и структурные гены образуют оперон. Белки, кодируемые генами одного оперона, – это, как правило, ферменты, катализирующие разные этапы одного метаболического пути. Транскрипция генов оперона ведет к синтезу одной общей молекулы иРНК.



Схематичное изображение лактозного оперона бактерий *E. coli*

Различают опероны индуцибельные и репрессибельные.

- **Индукцибельные опероны** ответственны за катаболизм углеводов: лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов.
- **Лактозный оперон** подвержен регуляции двух типов: 1) негативной (отрицательной) и 2) позитивной (положительной).



Механизм **негативной**, или **отрицательной**, регуляции. Работа лактозного оперона бактерий *E. coli*: А – без лактозы, Б – с лактозой.

- Лактозный оперон подвержен также регуляции другого типа – **позитивной**, или **положительной**.
- Белок БАК (расшифровывается: белок-активатор катаболитных оперонов), или CAP (*catabolite activator protein*).

- **Диауксия** – это приспособление микроорганизмов к росту в средах, содержащих два разных источника углерода. При диауксии микроорганизмы используют сначала один из источников с помощью конститутивного фермента, а затем другой – с помощью индуцибельного фермента. Диауксия была описана у *E. coli* Ж. Моно, а затем было установлено, что диауксия является одним из проявлений кatabолитной репрессии.
- **Кatabолитная репрессия** – это репрессия глюкозой. Означает замедление или остановку синтеза ферментов, участвующих в кatabолизме сахаров при выращивании бактерий в присутствии глюкозы, т.е. неспособность бактерий усваивать различные углеводы в присутствии глюкозы, как более эффективного источника энергии.

3. Наименование вопроса №3. Механизмы функционирования репрессибельных оперонов

- **Репрессибельные опероны** ответственны за синтез аминокислот аргинина, гистидина и триптофана.

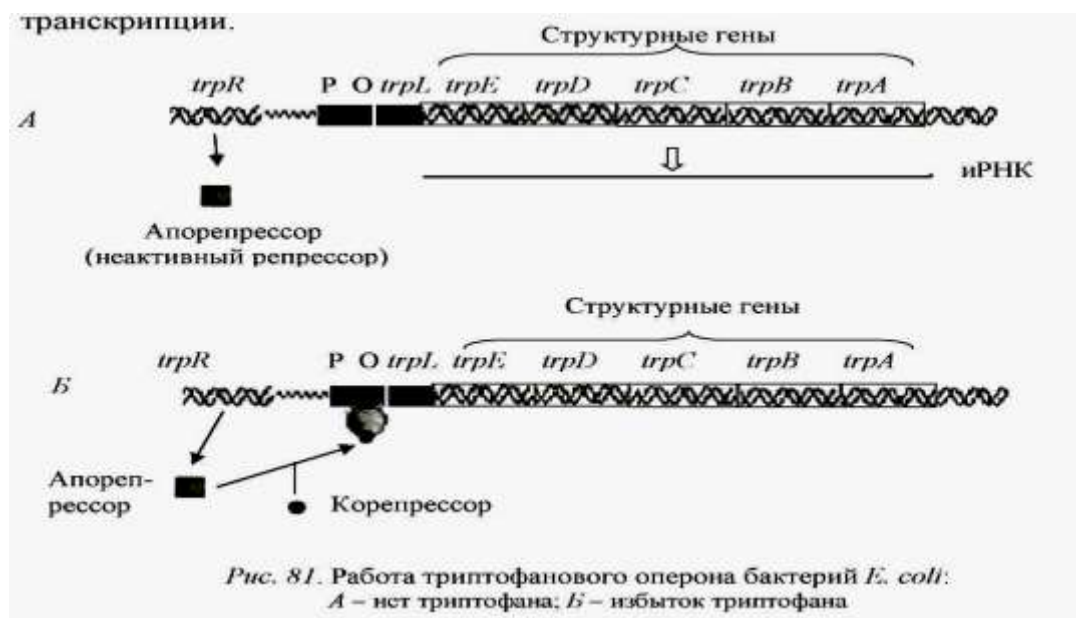


Рис. 7 -

Работа триптофанового оперона бактерий *E. coli*: А – нет триптофана; Б – избыток триптофана

- **Аттенуация** – механизм регуляции транскрипции генов, известный у ряда бактерий. Аттенуация является следствием преждевременной терминации синтеза иРНК в определенном участке гена – аттенуаторе.
- **Аттенуатор** – регулируемый терминатор транскрипции бактерий. Например, между генами триптофанового оперона *E. coli* содержится аттенуатор (***trp L***), который в условиях избытка триптофана обеспечивает снижение уровня синтеза *trp*- иРНК.
- Установлено, что в отличие от репрессии, аттенуация зависит не от самой аминокислоты триптофана, а от образования активированной аминокислоты, присоединенной к транспортной РНК, т.е. триптофанил-тРНК.

Таким образом, и в случае индукции путем негативной регуляции у *Lac*-оперона, и в случае репрессии синтеза ферментов у *Trp*-оперона взаимодействие репрессора с оператором приводит к подавлению транскрипции соответствующих структурных генов.

Различие заключается в том, что при индукции путем негативной регуляции эффектор (индуктор), взаимодействуя с репрессором, понижает сродство репрессора к оператору, а в случае репрессии эффектор (корепрессор) повышает это сродство.

1. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Регуляция синтеза ферментов у микроорганизмов».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Классификация микробных ферментов
2. Катаболическая репрессия
3. Репрессия конечным продуктом

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Механизмы регуляции синтеза ферментов

Ферменты разделяют на конститутивные и индуцибельные. Конститутивными называются ферменты, синтезируемые с одинаковой скоростью и содержащиеся в клетке в постоянной концентрации независимо от условий роста культуры. К таковым относятся ферменты гликолиза. Индуцибельными называются ферменты, синтезируемые только в ответ на присутствие в среде необходимого для клетки субстрата - индуктора. Количество индуцибельных ферментов может изменяться в зависимости от конкретных физиологических условий роста. Регуляция синтеза ферментов осуществляется путем индукции, репрессии и аттенуации. Индукция синтеза ферментов. Индуцибельный синтез ферментов в клетке идет только до тех пор, пока в среде присутствует индуктор. При этом фермент синтезируется заново и одновременно в большинстве клеток культуры. Индукторами синтеза ферментов являются многие субстраты, служащие питательными веществами. К индуцибельным относится большинство гидролитических ферментов. Классическим примером индуцибельных ферментов является β -галактозидаза *E. coli*, гидролизующая лактозу на галактозу и глюкозу. При выращивании *E. coli* на среде с лактозой клетки этой бактерии содержат множество молекул β -галактозидазы. При замене лактозы глюкозой в клетках обнаруживаются единичные молекулы этого фермента. Если клетки снова поместить в среду, содержащую только лактозу, то в них происходит интенсивный синтез β -галактозидазы ~ индуцибельный фермент. Одновременно с β -галактозидазой в клетках *E. coli* синтезируется β -галактозидпермеаза, необходимая для переноса яшсы в клетки, и ?Гаяапр;ктозвдграисацгшт2за, физиологическая роль которой пока не выяснена. Механизм индукции β -галактозидазы был изучен французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно, разработавшим модель оперона. Генетическими элементами модели оперона являются, регуляторный ген, оператор, набор структурных генов, промоторный участок. Они локализованы в хромосоме и все вместе, за исключением регуляторного гена, образуют одну функциональную единицу - оперон. Так, лактозный оперон (рис.7.9) *E. coli* включает три структурных гена - *z*, *y*, *a*, кодирующие* синтез трех ферментов - β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -галактозид-трансацетилазы. Рядом расположен ген-оператор (O), который выполняет функцию пускового механизма, контролируя работу структурных генов. По соседству с ним находится промотор (P) для связывания РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Регуляторный ген (R) кодирует синтез репрессора. Репрессор - аллостерический белок, один центр его служит для связывания с оператором, другой - с субстратом-индуктором (в данном примере с

аллолактозой, которая образуется из лактозы и является фактическим индуктором р-галактозидазы).

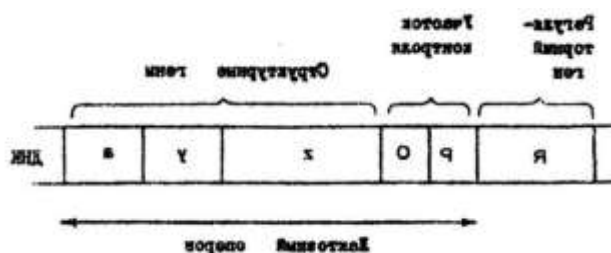


Рис. 7.9. Карта лактозного оперона *E. coli*

При отсутствии в среде лактозы репрессор активен в свободном состоянии и, связываясь с оператором, предотвращает возможность присоединения РНК-полимеразы к промотору и в результате структурные гены не транскрибируются в мРНК и синтез ферментов не происходит. Когда в клетку поступает лактоза, то образовавшаяся аллолактоза связывается с белком-репрессором. Конформация белка при этом меняется так, что приводит к разрыву связи с оператором. При свободном операторе начинаются транскрипция мРНК и синтез ферментов катаболизма лактозы. Аналогичным путем регулируется синтез и других индуцибельных ферментов.

2. Наименование вопроса №2. Катаболитная репрессия.

Синтез ферментов регулируется не только путем индукции, но и путем репрессии. Различают два вида репрессии: катаболитную и репрессию конечным продуктом. Наличие катаболитной репрессии было установлено при изучении явления диауксии, обнаруженной Моно при анализе роста *Bac. subtilis* на среде, содержащей глюкозу и арабинозу в качестве источника энергии и углерода. Вначале клетки потребляли только глюкозу, а затем по ее исчерпанию - арабинозу. Такое же явление наблюдалось и у *E. coli*: активно усваиваемая глюкоза подавляла потребление других сахаров. Это явление было названо катаболитной репрессией. Сущность ее заключается в том, что легкоусваиваемый клеткой источник энергии подавляет синтез ферментов катаболизма других менее доступных субстратов. Так, на среде, содержащей глюкозу и лактозу, клетки *E. coli* сначала потребляют глюкозу. Несмотря на наличие в среде индуктора лактозного оперона (лактозы) структурные гены не функционируют и ферменты катаболизма лактозы не синтезируются. Транскрипция генов лактозного оперона начинается при крайне низкой концентрации глюкозы в среде. Изучение механизма катаболитной репрессии показало, что она связана с уровнем содержания в клетках циклического АМФ, который необходим для транскрипции лактозного оперона. Циклический АМФ (эффе́ктор) связывается с белковым активатором катаболизма (БАК), или катаболитным активатором, которым является позитивно-регуляторный аллостерический белок, но в отсутствие циклического АМФ он неактивен. Образующийся комплекс (цАМФ + БАК) взаимодействует с участком промоторной области лактозного оперона и обеспечивает присоединение к промотору РНК-полимеразы и инициацию транскрипции (рис.7.10). Этот тип регуляции получил название позитивной.

Катаболитная репрессия функций лак

тозного оперона глюкозой при наличии в среде лактозы может быть снята при внесении в среду циклического АМФ. Это соединение выполняет только регуляторную функцию. Наличие в клетках глюкозы понижает внутриклеточную концентрацию циклического АМФ. Известно, что содержание его в клетках определяется активностью аденилатциклазы - фермента, катализирующего образование цАМФ из АТФ:



Аденилатциклаза связана с цитоплазматической мембраной и активна в том случае, если компоненты системы транспорта глюкозы в клетку фосфорилированы. Обычно это имеет место тогда, когда в клетке глюкозы нет или низкое содержание и ее надо транспортировать через мембрану. При наличии же глюкозы в достаточном для клетки количестве степень фосфорилирования системы транспорта снижается за счет фосфорилирования молекул поступающей глюкозы и соответственно снижается активность аденилатциклазы. Это приводит к уменьшению количества цАМФ и развитию в клетке кatabолитной репрессии.

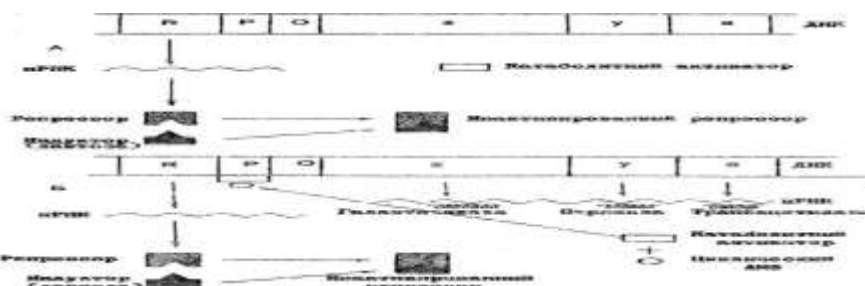


Рис. 7.10. Регуляция синтеза фермента на уровне транскрипции. А - ген-регулятор образует репрессорный белок, связывающийся с оператором /О/ и закрывающий промотор /Р/; транскрипции структурных генов /z,y, a/ не происходит; Б - в присутствии индуктора образуется неактивный репрессор, не способный связываться с оператором; промотор открыт, происходит транскрипция.

Таким образом, глюкоза сама по себе не вызывает кatabолитную реессию, а через систему своего транспорта регулирует концентрацию цАМФ. Последний, связываясь с кatabолитным активатором, образует универсальный комплекс, индуцирующий синтез ферментов, находящихся под контролем кatabолитной реессии.

Изучение работы лактозного оперона показало, что регуляция его функций может быть двоякой: негативной и позитивной. Негативная регуляция осуществляется на уровне взаимодействия репрессора с индуктором, позитивная - на уровне взаимодействия системы белкового кatabолитного активатора и циклического АМФ с промотором. У триптофанового оперона открыт еще один регуляторный компонент - аттенуатор (от аттенуация - ослабление). Это участок ДНК, который регулирует транскрипцию триптофанового оперона и синтез триптофана. В триптофановом опероне промотор и оператор отделены от структурных генов участком длиной 166 нуклеотидов. Это - лидерная последовательность, которая в свою очередь содержит ослабляющую последовательность, или аттенуатор. Он расположен между 123-150 нуклеотидами. На аттенуаторе около 90 % РНК- полимераз прекращают транскрипцию, не доходя до структурных генов. Это имеет место при высокой концентрации триптофана в клетке. Понижение уровня триптофана приводит к ослаблению действия аттенуатора и РНК-полимера за осуществляет полную транскрипцию оперона. В результате осуществляется синтез ферментов триптофанового пути и образование продукта (триптофана). Отсюда был сделан вывод, что транскрипция триптофанового оперона регулируется участком контролируемой терминции, называемым аттенуатором.

3. Наименование вопроса №3. Репрессия конечным продуктом.

Синтез большинства ферментов анаболизма находится под контролем механизма

репрессии конечным продуктом. Сущность его состоит в том, что по мере накопления в клетке конечного продукта биосинтеза снижается скорость синтеза ферментов, катализирующих его образование. Например, если выращивать кишечную палочку на минимальной среде, то ферменты, участвующие в биосинтезе аргинина, находятся в необходимом для клетки количестве и аргинин синтезируется по мере надобности. Если же в среду внести готовый аргинин (20 мг/л), то синтез ферментов, участвующих в его образовании, прекращается (репрессируется).

Изучение механизма репрессии синтеза ферментов конечным продуктом показало, что структурные гены многих ферментов анаболизма организованы в хромосоме также в виде оперона. Когда конечный продукт накапливается в клетках выше нужного уровня, он взаимодействует с белком репрессором, активируя его. Активированный репрессор присоединяется к операторному участку и блокирует инициацию транскрипции мРНК. Синтез ферментов прекращается. Таким образом, конечный продукт действует как компрессор. При его отсутствии репрессор неактивен. Хотя гены, кодирующие биосинтез ферментов одного метаболического пути, могут быть расположены в разных участках хромосомы, все равно, образование данных ферментов регулируется одним конечным продуктом. Так, в клетках кишечной палочки гены, кодирующие ферменты биосинтеза аргинина, локализованы в разных участках хромосомы, но все они репрессируются одним и тем же комплексом — белок-репрессор + аргинин. Более сложной является регуляция синтеза ферментов путем репрессии конечным продуктом в разветвленных путях анаболизма. Как и при регуляции активности, синтез ферментов регулируется так, что каждый конечный продукт может репрессировать образование ферментов только «своего» пути биосинтеза. В разветвленных путях биосинтеза может иметь место и мультиферментная репрессия, аналогичная таковой регуляции активности ферментов.

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Регуляция аэробного дыхания у микроорганизмов»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Общая характеристика феномена кислородной регуляции метаболизма
2. Гены, регулирующие аэробное дыхание
3. Гены, регулирующие аэробное дыхание у дрожжей

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Общая характеристика феномена кислородной регуляции метаболизма

Биохимические реакции необходимые для получения энергии можно представить как цепь последовательных этапов переноса электронов по замкнутой цепи. Подобный перенос происходит либо в цитоплазматических реакциях дисмутации, например, гликолиз, либо электроны поступают в цепь белков переносчиков, завершая свой путь на внешнем акцепторе (процесс дыхания). Первый механизм с использованием внутреннего акцептора (брожение) является наименее выгодным энергетически, анаэробное дыхание приносит больший выход полезной энергии. Наиболее выгодной формой энергетического метаболизма является аэробное дыхание с использованием кислорода в качестве акцептора электронов.

2. Наименование вопроса №2. Гены, регулирующие аэробное дыхание микроорганизмов

В ответ на любое воздействие, как отрицательное (например, анаэробные условия для аэробного микроорганизма), так и положительное (например, появление предпочтительного источника углерода в среде) в клетке изменяется экспрессия многих генов. Такой эффект является частью комплекса "глобальной регуляции метаболизма" и опосредуется сигнальными (или сенсорными) системами. Механизмы контроля могут быть сравнительно простыми, как, например, в случае индукции и репрессии, когда изменения внутриклеточных метаболических процессов являются прямой реакцией на изменение концентрации действующего фактора. В более сложных случаях включается механизм переноса внешнего сигнала через цитоплазматическую мембрану с последующей его передачей на определенный участок генома или органеллу (например, жгутик). Эти многоступенчатые механизмы предполагают наличие специального аппарата ("signal transduction system"), включающего мембранные рецепторы сигналов, а также белки, переносящие сигнал ("signaling proteins"). В процессе передачи сигнала, как правило, происходит ковалентная модификация белков (метилование, фосфорилирование, гомодимеризация). Такого рода регуляцию принято называть "глобальной". В ней участвуют как опероны и регулоны (группы оперонов), контролируемые общим регуляторным белком, так и модулоны, включающие несколько оперонов (до 50) и несколько белковых регуляторов, из которых, как правило, один является главным.

Входящие в модулон опероны и регулоны могут кодировать независимые процессы, однако результатом их совместного действия является быстрая реакция на внешний сигнал. Примером регуляции последнего типа может служить хемотаксис и другие тактические реакции, в результате которых организм (или его часть в случае многоклеточных организмов) перемещается в наиболее благоприятную для него зону (положение в пространстве). Важную роль в механизмах глобальной регуляции играют циклические и полифосфорилированные нуклеотиды (АМР, гуанозинтетрафосфат и др.). Изменение парциального давления кислорода в среде является типичным стрессовым воздействием и вызывает запуск защитных систем глобальной регуляции в клетке. Гены, экспрессия которых зависит от уровня кислорода, условно можно разделить на две группы: гены аэробноза (их экспрессия максимальна в аэробных условиях) и гены гипоксии (их экспрессия максимальна в микроаэробных и анаэробных условиях). Кислород-зависимые гены составляют значительную часть генома одноклеточных. Большинство компонентов дыхательной цепи, цитохромов и других белков, вовлеченных в строго аэробный метаболизм (например, ферментов, защищающих клетку от активных форм кислорода (АФК)), кодируются генами аэробноза. Большое число генов, индукция (или дерепрессия) которых происходит при переходе к условиям гипоксии и аноксии, также кодирует белки, участвующие в метаболических путях с использованием кислорода, в частности, альтернативные оксидазы электронной транспортной цепи, а также редуктазы и десатуразы, участвующие в биосинтезе гема, стероидов и ненасыщенных жирных кислот. Продукты этих генов, на первый взгляд, не должны функционировать в условиях гипоксии, однако именно тогда их экспрессия максимальна (например, ферментов биосинтеза гема и стероидов, использующих кислород как субстрат). Вероятно, индукция/дерепрессия этих генов необходима для увеличения эффективности соответствующих путей метаболизма в условиях нехватки кислорода. Повышение скорости кислород-зависимых процессов в условиях гипоксии может происходить либо путем увеличения скорости использования кислорода (за счет повышения количества ферментов), либо путем увеличения сродства ферментов к нему. Некоторые гены гипоксии кодируют изоформы ферментов, которые более эффективны в условиях гипоксии, чем их аэробные аналоги. Примером может служить функциональная

пара генов у дрожжей *sox5a-sox5b*, первый из которых относится к генам аэробноза и кодирует субъединицу Уа цитохром-с-оксидазы, второй - относится к генам гипоксии и кодирует субъединицу Уб цитохром-с-оксидазы. Цитохром-с-оксидаза с субъединицей Уб в условиях гипоксии имеет более высокую скорость оборота и окисления гема, чем аэробный аналог. В последнее время получены данные, что среди генов гипоксии имеются гены, экспрессия которых зависит не просто от наличия/отсутствия кислорода, а от его концентрации, или же максимальна не в условиях полного анаэробноза, а в условиях гипоксии (микроаэробноза). Примером второго типа является ген гипоксии *ole1*, кодирующий ключевую десатуразу биосинтеза ненасыщенных жирных кислот у *Saccharomyces cerevisiae*: его экспрессия максимальна (усиливается приблизительно в 4 раза по сравнению с нормоксией) при концентрации кислорода 0.5 мкМ, а затем при переходе к полному анаэробнозу начинает опять снижаться.

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

3. Наименование вопроса №3. Кислородная регуляция у дрожжей

Система кислородной регуляции экспрессии генов лучше всего изучена у *Saccharomyces cerevisiae*. Многие исследователи используют этот эукариот-ный микроорганизм как модельный, поскольку он способен к росту в анаэробных условиях. В сочетании с регуляцией экспрессии генов углеродными субстратами, кислородная регуляция позволяет эффективно использовать источники углерода и получать энергию в аэробных (дыхание + брожение) и анаэробных (только брожение) условиях. У дрожжей влияние кислорода на экспрессию генов опосредовано несколькими сигнальными системами. Наиболее изученной является система, в которой центральную роль играет гем. Широко известна и система, в которой роль сигнального элемента и общего регулятора факторов транскрипции играет эргостерин. Существуют и другие пути кислородной регуляции в клетке. Все они взаимозависимы и тесно переплетаются. Роль гемов в кислородной регуляции. Гемы -простетические группы цитохромов и некоторых кислород-связывающих белков, например, катала-зы. Гемы выполняют множественные регулятор-ные функции в клетках микроорганизмов, в том числе являются частью кислородной сигнальной системы у дрожжей. Кислород необходим для их биосинтеза. Фермент копропорфириноген-III-оксидаза использует кислород для образования протопорфи-риногена-IX, а протопорфириноген-IX-оксидаза использует кислород для образования протопорфи-рина. При этом этап синтеза с участием копропор-фириноген-III-оксидазы является скоростью-лимити-рующим. Таким образом, концентрация гема в клетке пропорциональна концентрации кислорода выше уровня 0.1 мМ. Все ферменты биосинтеза гема синтезируются в клетке конститутивно, даже в анаэробных условиях, и синтез гема начинается сразу же при переходе от анаэробных условий к аэробным. У *S. cerevisiae* гем активирует ядерные гены, кодирующие элементы кислородной дыхательной цепи, в том числе *sox5a*, *sox6*, *sox7*, *sox9*, *sox8* (субъединицы цитохром-с-оксидазы), *cyo1* (аэробная изоформа цитохрома с), *cor1*, *cor2*, *cor5* (убихинол-цитохром-с-редуктаза), *cyb2* (цитохром b2), *cyt1* (цитохром c1), *aac1*, *aac2* (аэробные изоформы ми-тохондриальной аденинтранслоказы), митохондри-альные гены *sox1* и *soxII*. Также, к гемозависимым генам аэробноза у *S. cerevisiae* относятся гены ответа на окислительный стресс *ctl1*, *ctal* (цитозольная и пероксисомальная формы каталазы), *sod1*, *sod2* (СиДп-супероксиддисмутаза, Мп-супероксиддисмутаза). Транскрипция гена *ctal* также регулируется (репрессируется) глюкозой. Гем активирует также ген *tif51a* (аэробная

изоформа фактора инициации трансляции eIF5A), *gox1* (репрессор генов гипоксии) и др. Гем подавляет транскрипцию генов *sox5b* (субъединица Vb цитохром-с-оксидазы), *cus7* (анаэробная изоформа цитохрома c), *aac3* (анаэробная изоформа митохондриальной аденинтранслоказы). К гемозависимым генам гипоксии относятся *erg11*, *cp11*, *hmg2* (синтез стерина), *ole1* (синтез жирных кислот), *hem13* (кодирует копропорфириноген-III-оксидазу-фермент скорость-лимитирующей стадии биосинтеза гема), *anb1* - (анаэробная изоформа фактора инициации трансляции eIF5A) [2, 3, 8-11]. Также к генам гипоксии относятся гены, участвующие в образовании псевдомицелия у *S. cerevisiae*, активируемые факторами регуляции транскрипции *Stel2*, *Tecl*, и фактором *Dig1* по принципу отрицательной связи. В анаэробных условиях для *S. cerevisiae* характерно образование клеток продолговатой формы вне зависимости от источника углерода и других факторов. У *S. cerevisiae* существуют функциональные пары генов-дублеров, генетически не связанных между собой.

1. 5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Регуляция процессов брожения. Химизм и практическое использование.».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Общая характеристика брожения и его регуляции
2. Молочнокислородное брожение, регуляция и его практическое использование
3. Спиртовое брожение, регуляция и его практическое использование
4. Пропионовокислородное брожение

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1. Общая характеристика брожения и его регуляции

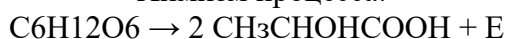
Брожение - анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого многие организмы получают энергию, необходимую для их жизнедеятельности. Брожение - эволюционно более ранняя и энергетически менее рациональная форма получения энергии из питательных веществ по сравнению с кислородным дыханием. К брожению способны бактерии, многие микроскопические грибы и простейшие. Брожение также может наблюдаться в клетках растений и животных в условиях дефицита кислорода. Сбраживанию подвергаются различные вещества. Это углеводы, органические кислоты, спирты, аминокислоты и другие вещества. Продуктами брожения являются различные органические кислоты (молочная, масляная, уксусная, муравьиная), спирты (этиловый, бутиловый, амиловый), ацетон, также углекислый газ и вода. Широкое распространение в природе имеет брожение молочнокислородное, маслянокислородное, уксуснокислородное, спиртовое и др. В основе молочнокислородного брожения лежит гликолиз, т.е. ферментативное расщепление глюкозы. Для большинства организмов в отсутствие кислорода деградация глюкозы до пирувата — это единственная возможность получения энергии для синтеза АТФ. При этом для поддержания процесса гликолиза и синтеза АТФ образующийся НАДН + H⁺ должен постоянно окисляться до НАД⁺. В организме высших животных этот процесс связан с восстановлением пирувата до лактата. У микроорганизмов регенерация НАД⁺ происходит по другим механизмам. К процессам этого типа относится **брожение**, или **ферментация**. Процессы брожения с участием микроорганизмов часто используются на практике при производстве пищевых продуктов, алкогольных напитков или консервировании. Все процессы брожения начинаются с образования пирувата и протекают только в анаэробных условиях.

2. Наименование вопроса № 1. Молочнокислое брожение, регуляция и его практическое применение

Молочнокислое брожение – процесс превращения углеводов молочнокислыми бактериями в молочную кислоту. Возбудители молочнокислого брожения подразделяются на 2 группы: гомоферментативные и гетероферментативные, которые, в свою очередь, вызывают гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение. В основу этого деления положены конечные продукты, образуемые при гомо- и гетероферментативном молочнокислом брожении.

Гомоферментативное молочнокислое брожение и его возбудители. При гомоферментативном молочнокислом брожении образуется преимущественно молочная кислота.

Химизм процесса:



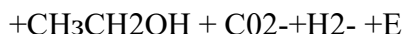
глюкоза молочная кислота

К гомоферментативным молочнокислым бактериям относятся молочнокислые стрептококки: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, а также молочнокислые палочки: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*.

Гетероферментативное молочнокислое брожение и его возбудители. Конечными продуктами при этом брожении являются не только молочная кислота, но и побочные продукты: уксусная кислота, этиловый спирт, янтарная кислота, диоксид углерода, водород. Суммарное уравнение процесса имеет вид:



глюкоза молочная кислота янтарная кислота уксусная кислота



этиловый спирт

К гетероферментативным молочнокислым бактериям относятся бактерии рода *Streptococcus*: *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*; бактерии рода *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, а также бактерии рода *Leuconostoc*: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris*.

Все молочнокислые бактерии - грамположительные, факультативные анаэробы. Среди молочнокислых бактерий есть мезофилы (предпочитают температуру около 30 °С) и термофилы (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), оптимальной температурой для которых является температура около 40–50 °С.

Молочнокислые бактерии отличаются высокой требовательностью к питательной среде: они нуждаются в полном наборе готовых аминокислот, в витаминах группы В12, в компонентах нуклеиновых кислот, что и определяет их распространение в природе.

Молочнокислые бактерии обитают в основном на растениях, плодах, овощах, в желудочно-кишечном тракте, в молоке и молочных продуктах, а также в местах разложения растительных остатков. В качестве источника углерода используют лактозу, мальтозу. Оптимальное значение pH для развития молочнокислых бактерий около 4. Молочнокислые бактерии образуют от 1 до 3,5 % молочной кислоты.

Практическое значение молочнокислого брожения. Оно находит широкое применение при изготовлении кисломолочных продуктов, сливочного масла, маргарина, используется в хлебопечении, при квашении овощей, силосовании кормов и производстве молочной кислоты.

Многие мезофильные гетероферментативные молочнокислые бактерии и лейконосток являются вредителями в производстве спирта, пива, вина, безалкогольных напитков, сахара и др.

3. Наименование вопроса № 3. Спиртовое брожение, регуляция и его

практическое использование

Спиртовое брожение - это процесс превращения в анаэробных условиях сахара в диоксид углерода и этиловый спирт: $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 27 \text{ ккал}$

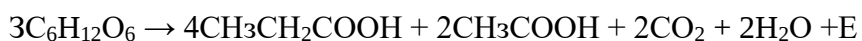
Сахар Этиловый Углекислый спирт газ Этиловый спирт - один из широко распространенных продуктов сбраживания Сахаров микроорганизмами. Даже растения и грибы в анаэробных условиях накапливают этиловый спирт. Рассмотрим химизм спиртового брожения. Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи, которые выращивают в аэробных условиях, подбирая соответствующие расы, обладающие необходимыми свойствами для данного производства. Процесс спиртового брожения осуществляется с тем же запасом энергии в форме АТФ и тем же ферментативным путем, что и гликолиз, вплоть до образования пировиноградной кислоты. Превращение пировиноградной кислоты в этиловый спирт происходит в два этапа. Сначала пируват (пировиноградная кислота) декарбоксилируется пируватдекарбоксилазой при участии тиаминпирофосфата до ацетальдегида, а затем ацетальдегид восстанавливается алкогольдегидрогеназой в этанол при участии $NADH_2$. При этом дрожжи получают энергию для развития биохимических процессов в клетке: глюкоза - этиловый спирт + $CO_2 + 166 \text{ кДж/моль}$. С энергетической точки зрения брожение - процесс малоэффективный. Так, если при окислении 1 граммолекулы глюкозы до CO_2 и H_2O в процессе аэробного дыхания синтезируется 36 моль АТФ, то в процессе спиртового брожения - всего 2 моль АТФ. Дрожжи могут переключать один тип обмена веществ (аэробный) на другой (анаэробный). Наряду с основными продуктами брожения - этиловым спиртом и CO_2 - образуются побочные продукты: глицерин, уксусный альдегид, уксусная кислота, янтарная кислота, а также так называемые сивушные масла. В состав сивушных масел входят пропанол, 2-бутанол, 2-метилпропанол, амиловый (пентанол) и изоамиловый (триметилбутанол) спирты, представляющие собой продукты нормального бродильного метаболизма дрожжей и обнаруживающиеся при росте дрожжей на любых средах. Пути синтеза этих веществ еще до конца не изучены. Высшие спирты участвуют в формировании аромата и вкуса напитков спиртового брожения. Дрожжи способны сбраживать помимо глюкозы и пировиноградную кислоту. В качестве промежуточного продукта при сбраживании пировиноградной кислоты образуется ацетальдегид; если к дрожжам, сбраживающим глюкозу, добавить бисульфит, то появится новый продукт - глицерин, однако при этом снижается выход этилового спирта и CO_2 . Брожение в присутствии бисульфита стали использовать в промышленности при производстве глицерина. На условия спиртового брожения влияют многие факторы: химический состав сбраживаемой среды, т.е. ее полноценность, концентрация и

кислотность среды, содержание спирта, температура, наличие посторонних микроорганизмов. Большинство дрожжей способны сбраживать моносахариды, сбраживать моносахариды, а из дисахаридов - сахарозу и мальтозу. Пентозы сбраживаются только некоторыми дрожжами. Дрожжи не могут сбраживать крахмал, так как они не образуют амилолитических ферментов. Наиболее благоприятная концентрация сахара в среде для большинства дрожжей составляет 10.15%. При повышении концентрации сахара энергия брожения снижается, а при 30.35% сахара брожение обычно прекращается. Энергией брожения называется способность определенного количества дрожжей сбраживать за определенный промежуток времени то или иное количество сахара. В природе встречаются дрожжи, способные вызывать брожение сахара даже при концентрации его 50.60% и выше. Хорошим источником азота для большинства дрожжей являются аммонийные соли, но дрожжи могут использовать также аминокислоты и пептиды. Брожение обычно протекает в кислой среде при pH 4.5 В щелочной среде в результате брожения образуется глицерин. Наибольшая скорость брожения наблюдается при температуре около 30.°C; при температуре 45.50°C брожение прекращается в результате гибели клеток дрожжей. Снижение температуры приводит к замедлению брожения, но полностью оно не прекращается даже при температуре ниже 0°C. Этиловый спирт, образующийся в процессе брожения, неблагоприятно влияет на дрожжи. Накопление дрожжами спирта в концентрации 2.5 % в зависимости от вида и расы дрожжей действует на них уже угнетающе. В большинстве случаев брожение прекращается при накоплении дрожжами 12.14% (объемных) спирта. Выведены селекционерами расы дрожжей, устойчивые к накоплению 16.18 и даже 20 % спирта. Использование спиртового брожения Использование спиртового брожения лежит в основе производства этилового спирта, пива, вина и пекарских дрожжей. Для получения этилового спирта используют разное сырье трех основных групп: содержащее сахар (сахарная свекла, кормовая патока, или меласса, сахарный тростник, фруктовые соки); содержащее крахмал (картофель, земляная груша, кукуруза, ячмень, овес, рожь, пшеница); содержащее целлюлозу (древесина и сульфитные щелока). Сырье используют в зависимости от хозяйственных возможностей; оно должно быть дешевым и в достаточном количестве. В настоящее время для осахаривания применяют также грибной солод (грибы рода аспергиллус), который во многих отношениях является выгоднее ячменного солода. В результате осахаривания крахмала образуется дисахарид мальтоза - солодовый сахар. Крахмалсодержащее сырье разваривают и подвергают осахариванию. Источником амилолитических ферментов служит солодовое молоко, изготовляемое из проросших зерен ячменя, или ферментный препарат из грибов рода *Aspergillus*. В солоде кроме

амилаз содержатся и протеолитические ферменты, которые вызывают частичное превращение белковых веществ в растворимые азотсодержащие вещества. В результате получается сусло, богатое как сахаристыми веществами, так и другими питательными веществами для дрожжей. Вносят и дополнительные источники питания. Это делается всегда по рецепту сред для каждого данного производства. В полученное сусло вносят дрожжи, чаще всего применяют расы *Saccharomyces cerevisiae*, которые быстро размножаются, спиртоустойчивы, обладают высокой энергией брожения. Есть и другие промышленно важные расы дрожжей. По окончании брожения дрожжи отделяют от сброженных заторов, а спирт отгоняют на специальных перегонных аппаратах. Получается спирт-сырец и остается отход производства - барда, которую используют для получения кормовых дрожжей. Отработанные дрожжи тоже используются в виде жидких и сухих кормовых дрожжей.

4. Наименование вопроса №4. Пропионовокислое брожение, регуляция и его практическое использование

Вызывается пропионовокислыми бактериями, относящимися к роду *Propionibacterium*. Единственным источником энергии для пропионовокислых бактерий является процесс сбраживания различных веществ: моносахаридов (гексоз, пентоз), молочной, яблочной кислот, глицерина и других в пропионовую и уксусную кислоту, диоксид углерода и воду. Химизм пропионовокислого брожения:



глюкоза пропионовая уксусная кислота кислота

Пропионовокислые бактерии - небольшие, неподвижные грамположительные палочки, не образующие спор, факультативные анаэробы. Обитают, в основном, в кишечном тракте жвачных животных и в молоке.

Практическое применение пропионовокислого брожения. Пропионовокислое брожение используется в сыроделии. Летучие кислоты (пропионовая и уксусная) придают сырам кисловато-острый вкус, а выделяющийся в виде пузырьков углекислый газ образует «глазки» в сыре. У пропионовокислых бактерий обнаружена способность к активному синтезу витамина В, поэтому они используются в качестве продуцента в микробиологической промышленности для получения этого витамина.

1. 6 Лекция № 6. (2 часа).

Тема: «Регуляция синтеза ДНК».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Репликация и клеточный рост

2. Репликация ДНК прокариотов

3. Регуляция транскрипции

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

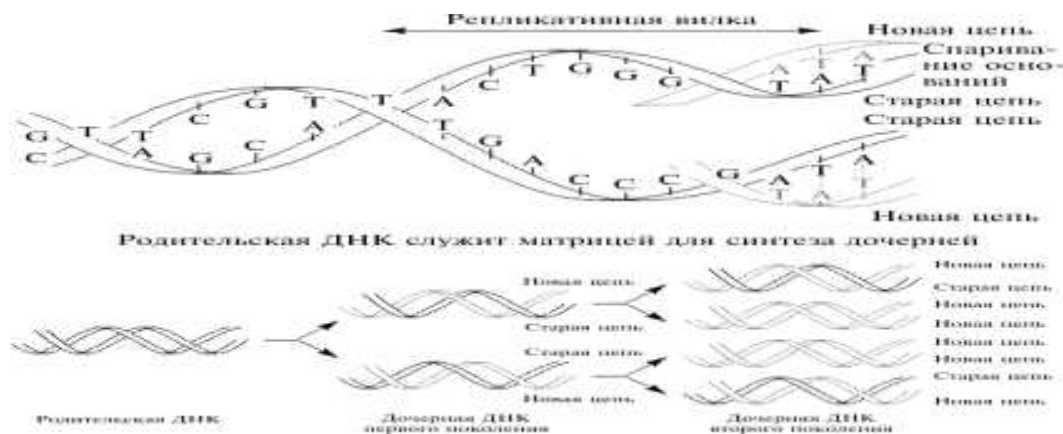
1. Наименование вопроса № 1. Репликация и клеточный рост

Репликация и клеточный рост у бактерий тесно связаны. Частота инициации циклов репликации определяется скоростью роста клетки, а завершение цикла репликации согласовано с делением клетки на две, в процессе которого дочерние молекулы ДНК разделяются. Клетки *E. coli* способны расти с различными скоростями: время удвоения варьирует от 18 до более чем 180 мин.

Скорость синтеза ДНК при постоянной температуре более или менее постоянна. Репликация происходит с одинаковой скоростью до тех пор, пока не наблюдается ограничений в снабжении молекулярными предшественниками. Для репликации всей кольцевой ДНК требуется примерно 40 мин. Еще примерно 20 мин требуется между завершением репликации и клеточным делением, с которым она связана, для наработки компонентов, принимающих участие в делении. Отсюда следует, что при быстром делении бактериальных клеток ДНК дочерних клеток в момент их разделения уже частично реплицирована. Предполагают, чтобы начать репликацию ДНК, прикрепляется своим участком с точкой начала репликации к определенной белковой структуре на мембране бактериальной клетки. ДНК остается прикрепленной к мембране в ходе деления клетки, и за счет роста мембраны между ними дочерние молекулы ДНК распределяются по двум дочерним клеткам.

2. Наименование вопроса № 2. Репликация ДНК у прокариотов

Информация, записанная в ДНК, должна быть не только реализована в процессе развития клеток и организмов, но и в полном объеме передана следующему поколению. С этой целью перед делением клетки в ней осуществляется процесс **репликации**, т.е. удвоения количества ДНК. Информация о механизме репликации содержится в самой ДНК: одни гены кодируют ферменты, синтезирующие предшественники ДНК — нуклеотиды, другие — ферменты, обеспечивающие соединение активированных нуклеотидов в единую цепочку. Механизм репликации был впервые постулирован Дж. Уотсоном и Ф. Криком, которые отмечали, что комплементарность цепей ДНК наводит на мысль, что эта молекула может удваивать саму себя. Они предположили, что для удвоения необходим разрыв водородных связей и расхождение цепей, каждая из которых играет роль матрицы при синтезе комплементарной цепи. В результате одного акта удвоения образуются две двунитиевые молекулы ДНК, в каждой из которых имеется одна материнская нить и одна новая .



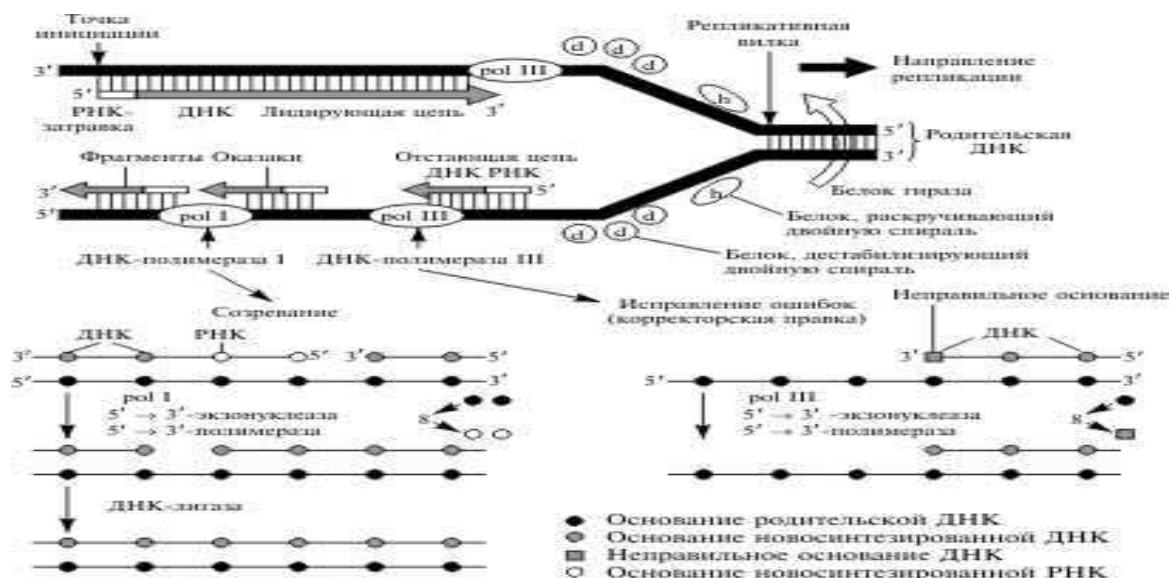
Полуконсервативная репликация ДНК

Механизм получил название **полуконсервативной репликации**. Позже матричная природа и постулированный принцип репликации ДНК были подтверждены многочисленными экспериментальными данными.

Репликация ДНК начинается в специфических точках хромосомы — сайтах инициации репликации (origin). Процесс репликации обслуживается большим количеством ферментов. Наиболее полно изучен аппарат репликации бактериальной ДНК, особенно *E. coli*. Функцию расплетания молекулы ДНК у прокариот выполняют специфические ферменты **геликазы**, которые используют для работы энергию гидролиза АТФ до АДФ. Они часто функционируют в составе белкового комплекса, осуществляющего перемещение вилки и репликацию расплетенных нитей. Удерживают нити ДНК от воссоединения другие специфические белки, связывающиеся с одноцепочечными участками. Эти участки, разошедшиеся в разные стороны, образуют характерную структуру — репликативную вилку (вилку Кернса). Это — та часть молекулы ДНК, в которой в данный момент осуществляется синтез новой цепи. В продвижении вилки большую роль играет белок **гираза**, относящийся к разряду топологических изомераз. Он обнаружен только у бактерий. Гираза — это релаксирующий фермент, который, производя двунитиевые разрывы, снимает положительные (перед вилкой) и способствует образованию отрицательных (сзади вилки) супервитков в релаксированной ДНК.

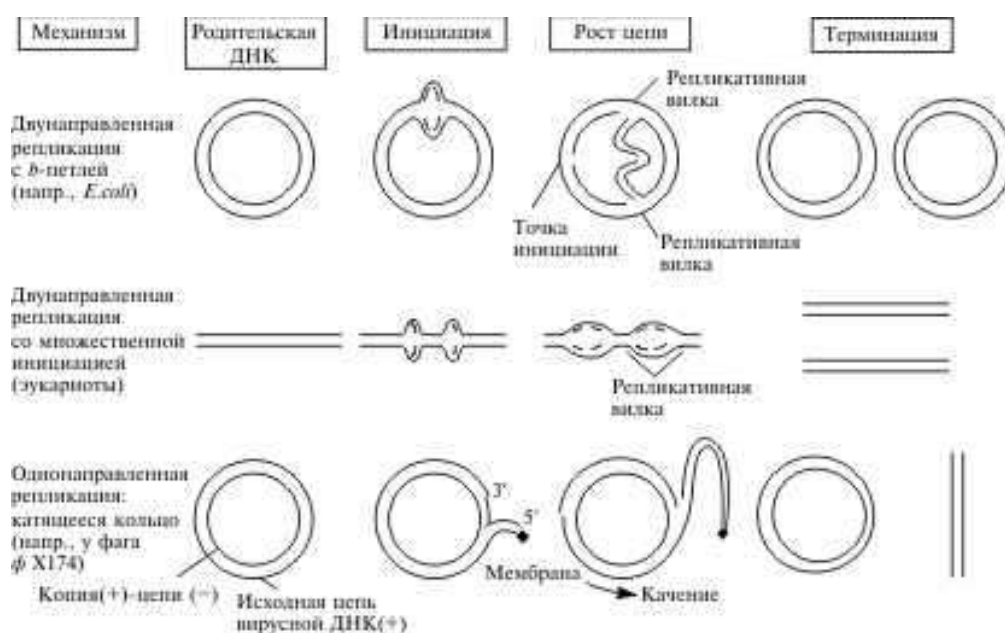
Каждая цепь материнской ДНК служит матрицей для синтеза дочерних молекул. На одной цепи синтез осуществляется непрерывно в направлении от 5' к 3' концу. Эта цепь называется лидирующей. Вторая цепь с противоположной направленностью, называемая отстающей, синтезируется в виде отдельных фрагментов, которые затем сшиваются лигазами в непрерывную молекулу. Фрагменты названы по имени американского ученого Р. Оказаки, впервые постулировавшего такой способ синтеза ДНК, **фрагментами Оказаки**. В ходе синтеза репликативная вилка перемещается вдоль матрицы, и при этом новые участки ДНК последовательно расплетаются до тех пор, пока вилка не дойдет до точки окончания синтеза (точка терминации).

Схема репликации ДНК у *Escherichia coli*



Синтез новой цепи ДНК требует затравки в виде небольшого фрагмента РНК, т.к. ведущий его фермент ДНК-полимераза для работы нуждается в свободной 3'ОН группе. У прокариот обнаружены три разных ДНК-полимеразы с аналогичными функциями, обозначаемые как pol I, pol II и pol III. Наиболее полно изучена ДНК-полимераза I. Она представляет собой одиночный полипептид с мультифункциональной активностью (полимеразной, 3' → 5' экзонуклеазной и 5' → 3' экзонуклеазной). Синтез затравки (праймера) осуществляет фермент праймаза, который иногда входит в состав комплекса — праймосомы из 15-20 белков, активирующих матрицу. Затравка состоит из 10-60 рибонуклеотидов. После того как ключевой фермент синтеза ДНК у *E. coli* — pol III — присоединяет к затравке первые дезоксирибонуклеотиды, она удаляется с помощью pol I, обладающей 3' → 5' экзонуклеазной активностью, т.е. способностью отщеплять концевые нуклеотиды с 3'-конца цепи. Затравка синтезируется также и в отстающей цепи в начале каждого фрагмента Оказаки. Ее отщепление, а также удлинение фрагментов, синтезированных pol III, осуществляет pol I. Роль pol III в репликации ДНК *E. coli* до сих пор не совсем ясна.

Схема разных механизмов репликации ДНК у бактерий, эукариот и бактериофагов



Репликация бактериальной ДНК является двунаправленным процессом с одним сайтом инициации. В отличие от этого хромосома эукариот состоит из отдельных участков репликации — репликонов и имеет много сайтов инициации. Репликоны могут реплицироваться в разное время и с разной скоростью. Скорость репликации ДНК в эукариотических клетках значительно ниже, чем в прокариотических. У *E. coli* скорость приблизительно равна 1500 п.н. в секунду, у эукариот — 10-100 п.н. в секунду. Двухцепочечные кольцевые ДНК некоторых вирусов реплицируются по типу катящегося кольца. В этом случае одна цепь ДНК надрезается в одном месте специфическим ферментом и к образовавшемуся свободному 3'ОН-концу с помощью фермента polIII начинают присоединяться нуклеотиды. Матрицей служит внутренняя кольцевая молекула. Надрезанная цепь при этом вытесняется, а затем удваивается по типу отстающей цепи *E. coli* с образованием фрагментов, которые сшиваются лигазами.

3. Наименование вопроса №3. Регуляция транскрипции

Транскрипция не связана с фазами клеточного цикла; она может ускоряться и замедляться в зависимости от потребности клетки или организма в определенном белке. Такое избирательное функционирование возможно благодаря существованию механизмов регуляции генной экспрессии, которые действуют на разных уровнях. С помощью этих механизмов клетка экономит свои ресурсы и в каждый момент времени синтезирует определенный набор веществ, а не весь возможный их спектр.

Среди нескольких уровней регуляции экспрессии генов наиболее существенной и часто используемой является регуляция синтеза белков, которая осуществляется на уровне транскрипции. Суть такого типа регуляции сводится к ускорению или замедлению процессов транскрипции определенных генов, что в конечном итоге отражается на скорости синтеза их продуктов.

Наилучшим образом регуляция транскрипции генов изучена у прокариот. Их особенностью является организация генов, участвующих в одном метаболическом пути, в особые структурные единицы — **опероны**. Оперонами называют участки молекулы ДНК, которые содержат информацию о группе функционально связанных структурных белков, и регуляторную зону, контролирующую транскрипцию этих генов. Структурные гены оперона экспрессируются согласованно: либо все сразу, либо ни один из них. Это дает возможность прокариотам «включать» и «выключать» транскрипцию такой группы генов одновременно. Связывание РНК-полимеразы с промотором зависит от присутствия белка-репрессора на смежном с промотором участке — **операторе**. **Белок-репрессор** (продукт **гена-регулятора**, не входящего в оперон) синтезируется в клетке с постоянной скоростью и имеет сродство к операторному участку. Структурные участки промотора и оператора частично перекрываются, поэтому присоединение белка-репрессора к оператору создает стерическое препятствие для присоединения РНК-полимеразы и соответственно делает невозможной транскрипцию структурных генов. Гипотеза оперона была предложена Ф.Жакобом и Ж.Моно на основании данных, полученных при изучении свойств лактозного оперона *E.coli*, т.е. оперона, в котором закодированы белки, участвующие в усвоении лактозы. Клетки кишечной палочки обычно используют в качестве источника углерода глюкозу. Но, если в среде культивирования глюкозу заменить на лактозу, клетки в течение нескольких минут перестраиваются и начинают утилизировать лактозу. Теория оперона объясняет это явление следующим образом. В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором, блокируя таким образом транскрипцию структурных генов. Когда в среде появляется индуктор, т.е. лактоза, то он присоединяется к белку-репрессору, изменяет его конформацию, снижает сродство к оператору и способствует отделению репрессора от оператора. РНК-полимераза связывается со

ставшим доступным промотором и транскрибирует структурные гены. Это явление называется *индукцией* синтеза белков.

Регуляция транскрипции генов высших организмов сходна с регуляцией экспрессии генов прокариот. Основное различие состоит в значительно большем количестве участков ДНК и регуляторных факторов, контролирующих этот процесс. Скорость транскрипции в основном определяется скоростью формирования инициаторного комплекса. В настоящее время идентифицировано более 100 белков, способных взаимодействовать со специфическими регуляторными последовательностями ДНК, влияя тем самым на процесс сборки транскрипционного комплекса. Эти белки имеют один или несколько доменов, обеспечивающих выполнение регуляторных функций: ДНК-связывающие домены, ответственные за узнавание и связывание регуляторных факторов со специфическими участками на молекуле ДНК; домены, активирующие транскрипцию за счет связывания с транскрипционными факторами, коактиваторами или РНК-полимеразой; антирепрессорные домены, благодаря которым белки способны взаимодействовать с гистонами нуклеосом и освобождать участки ДНК для транскрипции; домены, связывающие лиганды. Присоединение лиганда способствует формированию ДНК-связывающего участка, узнающего специфическую последовательность в регуляторной зоне ДНК и индуцирующего/подавляющего транскрипцию определенных генов. К лигандам-индукторам транскрипции относятся стероидные гормоны, ретиноевая кислота, кальцитриол и гормоны щитовидной железы. Репрессорами могут быть конечные продукты метаболических путей.

На молекуле ДНК на небольшом расстоянии до стартовой точки транскрипции имеются короткие специфические последовательности: ЦААТ-элемент, ЦГ-бокс и октамерный бокс, узнающие факторы транскрипции. Эти элементы есть во всех клетках, и постоянно транскрибируемые гены нуждаются только в них. В то же время для генов, подвергающихся адаптивной регуляции, обнаружены участки молекулы ДНК, более удаленные от промотора, но тоже участвующие в транскрипции. Эти нуклеотидные последовательности бывают двух типов. **Энхансеры** – участки ДНК, присоединение к которым регуляторных белков увеличивает скорость транскрипции. Если же участки ДНК, связываясь с белками, обеспечивают замедление транскрипции, то их называют **сайленсерами**.

1. 7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Регуляция клеточной дифференцировки и клеточного цикла у микроорганизмов».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Клеточный цикл
2. Модификации при клеточной дифференцировке (споры, акинеты, цисты)

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1. Клеточный цикл

Типы вегетативного клеточного цикла (моно-, ди-, полиморфный). Клеточный цикл – период от возникновения организма до прекращения его существования – онтогенез одноклеточных, включает процессы, связанные с ростом и делением клеток. Продолжительность клеточного цикла у бактерий может составлять всего 20-30 мин. В процессе роста клетки идет линейное непрерывное увеличение ее поверхности и объема.

К делению клетки приводит последовательность событий, в которой может быть выделен ряд периодов. Их рассматривают как этапы клеточного цикла. Период I предшествует началу репликации хромосомы (инициация), т.е. в течение этого времени у новой клетки синтеза ДНК не происходит. За периодом I следует период C, в течение которого происходит инициация репликации, репликация ДНК и ее терминация. Третий период D занимает время от терминации репликации хромосомы до разделения клетки. Иногда выделяют еще T-период – время от начала до конца образования перегородки или перетяжки между дочерними клетками. Длительность каждого периода зависит от времени генерации. Например, процесс образования перетяжки у *Escherichia coli*, т.е. T-период, при времени генерации в 60 минут и менее составляет примерно 10 минут. Между завершением образования перетяжки и расхождением дочерних клеток проходит не более минуты. Обнаружена определенная взаимозависимость между скоростью роста клетки, ее средней массой и состоянием хромосомы. Инициация репликации хромосомы, т.е. первое событие, приводящее, в конечном счете, к делению клетки, контролируется массой клетки. Репликация хромосомы произойдет в клетке по достижении ею определенной массы (удвоение) и увеличении линейных размеров. Клеточный цикл, не связанный с дифференцировкой, носит название вегетативного клеточного цикла. Различают следующие типы вегетативного клеточного цикла: мономорфный, диморфный, полиморфный. При мономорфном вегетативном клеточном цикле, характерном для большинства бактерий, образуется один морфологический тип клеток. При диморфном – образуется 2 типа клеток, различающихся формой, размерами. У грамотрицательных, например стебельковых форм рода *Caulobacter*, при размножении образуются 2 типа клеток: подвижные, со жгутиками, дочерние и неподвижные, имеющие стебелек, материнские. Каждая из форм отличается клеточным циклом. Стадии жизненного цикла *Caulobacter*. Схема (по Броку, 1970). Полиморфный клеточный цикл отмечен у бактерий, которые в зависимости от среды обитания образуют 2 и больше морфологических типа клеток. Характерен для почкующихся бактерий *Rhodospseudomonas*, *Nurphomicrobium*, *Rhodomicrobium*. У них может быть диморфный клеточный цикл, когда материнская клетка дает гифу, на конце которой имеется почка со жгутиком. У *Nurphomicrobium* на среде с метанолом наблюдается подобный диморфный клеточный цикл. На метиламине образуются кистевидные клетки, от которых отпочковываются подвижные дочерние. В старых культурах образуются треугольные, многогранные, лопастные почки на гифах. У *Arthrobacter* смена форм зависит от фазы роста культуры (в логарифмической фазе крупные неправильной формы палочки; в стационарной – кокки; в свежей среде – короткие палочки, иногда V-образные).

2. Наименование вопроса №2. Модификации при клеточной дифференцировке

В результате модификации клеточного цикла бактерии могут образовывать специализированные, морфологически дифференцированные структуры: покоящиеся формы, клетки со специализированными метаболическими функциями, формы, служащие для размножения. Покоящиеся формы: Эндоспоры - покоящиеся, неспособные к размножению формы, образуемые некоторыми (исключительно грамположительными) бактериями типа Firmicute. Эндоспоры образуются в результате впячивания внутрь клетки части её собственной цитоплазмы. Образование эндоспор запускается при недостатке питательных веществ с целью пережить неблагоприятный период. Когда условия среды улучшаются, спора прорастает, возвращаясь к состоянию вегетативной клетки. Эндоспоры могут сохраняться очень долго, возможно, до 1000 лет при нормальных условиях (были описаны случаи прорастания спор, возраст которых насчитывает несколько миллионов лет). Однако при 100°C 90% эндоспор гибнут через 11 минут; 99% спор актиномицетов гибнет при 75°C через 70 минут, при высушивании они сохраняют жизнеспособность до 15 лет. При неблагоприятных условиях внутри материнской клетки

(спорангия) образуется эндоспора, причём в каждой материнской клетке формируется одна спора (описана анаэробная бактерия, образующая в клетке до 3—5 эндоспор). Процесс спорообразования продолжается 5—13 часов. Спорообразование идёт с затратой питательных веществ. В начале спорообразования в клетке падает содержание глюкозы и поли-β-оксималяной кислоты, синтезируется дипиколиновая кислота (она отсутствует в нормальной вегетативной клетке), накапливаются ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и K^{+} . Процесс спорообразования протекает в несколько этапов: цитолемма инвагинируется, быстро углубляясь, так что клетка оказывается разделённой на две части: меньшую, содержащую часть генетического материала (будущая спора), и большую. Отделённая часть покрывается цитолеммой материнской клетки. В итоге формируется проспора с двумя плазматическими мембранами. Между плазматическими мембранами проспоры синтезируется кора (кортекс) из пептидогликана, а за счёт материнской клетки формируются споровые оболочки: полипептидная наружная оболочка и экзоспорий, состоящий из белков и липидов. Материнская клетка разрушается, спора освобождается. Этапы образования споры до стадии проспоры обратимы, после этого этапа процесс спорообразования уже становится необратимым. Установлено, что если добавить к спорулирующей культуре антибиотик хлорамфеникол, то обрастание отделённого участка цитоплазмы материнской клетки останавливается, и вместо спорообразования происходит обычное клеточное деление. Формирование эндоспоры спорообразующими бактериями, этапы: вегетативная клетка; инвагинация ЦПМ; образование споровой перегородки (септы); формирование двойной мембранной системы образующейся проспоры; сформированная проспора; формирование кортекса; формирование покровов споры; лизис материнской клетки; свободная зрелая спора, прорастание споры.

Прорастание споры включает в себя 3 этапа: - активация; - инициация; - собственно прорастание. Прорастание споры активируется при прогревании. Его также активируют глюкоза и другие углеводы, многие аминокислоты (в первую очередь L-аланин), а также некоторые ионы. За активацией следует инициация прорастания, в ходе которой происходит гидратация споры, активация ферментных систем и дыхания, удаление ионов кальция и дипиколиновой кислоты. После этого следует собственно прорастание, при котором из споры вырастает ростовая трубка, которая разрывает оболочку.

Цисты - временная форма существования микроорганизмов (обычно бактерий и простейших, многих одноклеточных), характеризующаяся наличием защитной оболочки, которая образуется в неблагоприятных условиях или в определенные моменты их жизненного цикла, а также сама эта оболочка. Некоторые простейшие могут существовать в неблагоприятных условиях в форме цисты до нескольких десятков лет. Цисты представителей рода *Azotobacter* являются более устойчивыми к действию неблагоприятных факторов внешней среды, чем вегетативные клетки — так, цисты в два раза более устойчивы к действию ультрафиолетового излучения чем вегетативные клетки, устойчивы к высушиванию, гамма-излучению, солнечной радиации, действию ультразвука, однако не являются устойчивыми к действию высоких температур. Формирование цист индуцируется изменением концентрации питательных веществ в питательной среде, добавлением некоторых органических веществ (например этанола, н-бутанола и β-гидроксипропирата) к питательной среде, цисты редко образуются в жидких питательных средах, инцистирование может быть индуцировано химическими факторами, инцистирование сопровождается метаболическими сдвигами, изменениями в катаболизме и дыхании, изменениями в биосинтезе макромолекул. Циста представляет собой сферическое тело, состоящее из центрального тела, представляющего собой уменьшенную копию вегетативной клетки с большим количеством вакуолей, и двуслойной оболочки, внутренняя часть которой называется интима, имеющая волокнистое строение, а внешняя экзина, представленная ровной, отражающей структурой, имеющей гексагональное кристаллическое строение, экзина частично гидролизует трипсином и устойчива к действию лизоцима в отличие от центрального

тела. Центральное тело может быть изолированно в жизнеспособном состоянии некоторыми хелатирующими агентами. Главными компонентами внешней оболочки цисты являются алкилрезорцинолы, состоящие из длинных алифатических цепей и ароматических колец, также представлены среди других бактерий, животных и растений. Цисты встречаются у разных групп эубактерий: азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий. У большинства миксобактерий образование цист, называемых также миксоспорами,— закономерная стадия их жизненного цикла. После окончания стадии активного размножения клетки миксобактерий собираются вместе и образуют так называемые плодовые тела, представляющие собой массу слизи, в которую погружены клетки, или весьма дифференцированные структуры, поднимающиеся над поверхностью субстрата на простых или разветвленных стебельках. Внутри плодовых тел клетки переходят в покоящееся состояние. У одних видов цисты могут морфологически не отличаться от вегетативных клеток, у других их образование сопровождается заметными морфологическими и структурными изменениями: происходит утолщение стенки вегетативной клетки, в результате чего формируются оптически плотные, более сильно преломляющие свет, окруженные капсулой укороченные палочки или сферические формы. Образование микоспор сопровождается синтезом белка, так что сформированная микоспора содержит около 1/3 заново синтезированного белка. ДНК не синтезируется, а переходит из исходных вегетативных клеток. Генетический аппарат микоспор может быть представлен тремя или четырьмя копиями хромосомы вегетативной клетки. У азотобактера образование цист сопровождается изменением морфологии клетки, потерей жгутиков и накоплением в цитоплазме в больших количествах гранул поли- β -оксимасляной кислоты; одновременно происходит синтез дополнительных клеточных покровов: внешних (экзина) и внутренних (интина) по отношению к клеточной стенке, различающихся структурно и химическим составом. Строение покоящихся форм прокариот: А — микоспоры миксобактерий; Б — цисты азотобактера; В — акинеты цианобактерий; Г — эндоспоры; 1 — нуклеоид; 2 — цитоплазма; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — капсула; 6 — гранулы запасных веществ; 7 — внутренние покровы (интина); 8 — внешние покровы (экзина); 9 — тилакоиды; 10 — чехол; 11 — внутренняя мембрана споры; 12 — наружная мембрана споры; 13 — кортекс; 14 — покровы споры, состоящие из нескольких слоев; 15 — экзоспориум (по Дуде, Пронину, 1981).

3. Экзоспоры - специфические покоящиеся формы бактериальных клеток. Их образуют многие актиномицеты, некоторые метанутилизирующие бактерии рода *Methylosinus* (напр. *Methylosinus trichosporium*), некоторые пурпурные бактерии рода *Rhodomicrobium* (напр. *Rhodomicrobium vannielii*). Экзоспоры образуются путём почкования исходной вегетативной клетки. Например, у актиномицетов гифы делятся перегородками (септами) на несколько структур, которые превращаются в споры. Стенка споры очень толстая. Экзоспоры, как и эндоспоры, очень устойчивы к неблагоприятным воздействиям извне: обезвоживанию, повышенной температуре, радиации, химическому воздействию. Метаболизм в них почти полностью прекращён, они содержат очень мало влаги. Таким образом, в отличие от эндоспор, экзоспоры формируются не внутри клетки, а снаружи отпочковываются от неё. Кроме того, у экзоспор отсутствуют дипиколиновая кислота и характерные для эндоспор структуры (кортекс, экзоспориум). Экзоспоры *Methylosinus trichosporium* (у/с; масштабный отрезок – 0,5 мкм): 1-2 и 5-6 - штамм 5; 3 - шт.ОВ4; 4 - шт.34; 7 - шт.44.

4. Акинеты - покоящиеся клетки цианобактерий с утолщённой оболочкой, большим количеством запасных питательных веществ и пигментов. Образуются из вегетативных клеток и служат для переживания неблагоприятных условий (устойчивы к пониженным температурам и высушиванию) и размножения. Акинеты обычно сравнивают с эндоспорами грамположительных бактерий. Однако, в отличие от эндоспор, акинеты метаболически активны, не так хорошо устойчивы к экстремальным условиям среды. Акинеты бывают только у тех цианобактерий, которые формируют гетероцисты. Акинеты, как правило, заметно крупнее вегетативных клеток, имеют

продолговатую или сферическую форму, гранулированное содержимое и толстую многослойную оболочку. Оболочки акинет содержат больше липидов и полисахаридов, а цитоплазма — меньше воды, чем вегетативные клетки. Скорость фотосинтеза в акинетах ниже, а дыхания выше, чем в вегетативных клетках. Основным, но не единственным, фактором для развития акинет является недостаток света. Недостаток ряда питательных веществ, например фосфора или CO₂, также можно считать фактором для развития акинет. Также на дифференцировку акинет могут оказывать влияние внеклеточные сигналы. Например, культура *Cylindrospermum licheniforme* выделяет соединение (C₇H₅OSN), которое стимулирует формирование акинет в молодых культурах. Обычно, акинеты образуются при достижении стационарной фазы роста. Образование акинет начинается с увеличения клеточных размеров, при этом в цитоплазме происходит накопление гранул запасных веществ (гликогеновых, полифосфатных, цианофициновых), а также карбокисом. Одновременно происходит утолщение пептидогликанового слоя клеточной стенки и уплотнение слизистого чехла за счет отложения в нем электронно-плотного фибриллярного материала полисахаридной природы. В цитоплазме увеличивается содержание ДНК, рибосом, уменьшается количество хлорофилла и фикобилиновых пигментов. Важнейшим стимулом для прорастания акинет является увеличение интенсивности света. Существует 2 механизма прорастания акинет. Чаще всего окружающая клетку оболочка остаётся интактной, за исключением поры на одном конце, через которую проросток выходит наружу, подвергнувшись одному или двум клеточным делениям, реже большому числу клеточных делений. Иногда прорастание акинет происходит путём полного растворения оболочки. Акинеты (а) и гетероцисты (Г) нитчатой цианобактерии *Cylindrospermum* Структуры, служащие для репродукции (баеоциты, гормогонии, экзоспоры). Баеоциты. Для одной группы одноклеточных цианобактерий описано размножение путем множественного деления. Оно начинается с предварительной репликации хромосомы и увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри дополнительного фибриллярного слоя материнской клеточной стенки. Это приводит к образованию мелких клеток, получивших название баеоцитов, число которых у разных видов колеблется от 4 до 1000. (Баеоцит в переводе с греческого - маленькая клетка). Освобождение баеоцитов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки. Таким образом, в основе множественного деления лежит принцип равновеликого бинарного деления. Отличие заключается в том, что в этом случае после бинарного деления не происходит роста образовавшихся дочерних клеток, а они снова подвергаются делению. А - цикл развития цианобактерий рода *Dermocarpa* : 1 - увеличение объема баеоцита до размеров вегетативной клетки; 2 - множественное деление, приводящее к образованию баеоцитов; 3 - разрыв материнской клетки и освобождение подвижных баеоцитов; 4 - синтез внешнего слоя клеточной

1. 1 Лекция № 8 (2 часа).

Тема: «Регуляция хемотаксиса. Цитоплазматические сигнальные белки».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Хемотаксис бактерий.
2. Регуляция хемотаксиса
2. Цитоплазматические сигнальные белки

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1. Хемотаксис бактерий

Белковый аппарат хемотаксиса. Три класса белков участвуют в хемотаксисе: трансмембранные рецепторы, цитоплазматические сигнальные белки и ферменты адаптивного метилирования.

Многие бактерии детектируют хемотаксические стимулы при помощи рецепторов, известных как метилируемые белки хемотаксиса (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs). Эти белки являются мембранными сенсорами, в принципе аналогичными по своей структуре EnvZ, с тем только отличием, что цитоплазматический сигнальный домен не является автокиназой. Функцию автокиназы выполняет другой белок - CheA, а сигнальные домены MCP обеспечивают взаимодействие с CheA. Еще одно отличие от типичного сенсора - по обе стороны сигнального домена располагаются сайты метилирования, необходимые для адаптации рецепторов. MCP белки состоят из ок. 550 аа, и явл. димерами. Хорошо изучены 4 MCP из *E. coli*, реагирующие на серин (Tsr), аспартат и мальтозу (Tar), рибозу, глюкозу и галактозу (Trg) и дипептиды (Tap). У сальмонелл нет Tap, но есть сенсор цитрата Tcr. Серин, аспартат и цитрат связываются непосредственно с рецепторами, тогда как сахара и дипептиды сначала связываются с соответствующими периплазматическими белками, а уже эти комплексы взаимодействуют с рецепторами. Кроме того, MCP реагируют на изменения температуры и pH, а также являются рецепторами для различных репеллентов. Классический рецептор состоит из: 1) аминоконцевой трансмембранной спирали, 2) периплазматического собственно сенсорного домена, сложенного из четырех α -спиральных участков, 3) второй трансмембранной спирали, 3) большого цитоплазматического сигнального и адаптационного домена. Цитоплазматические домены сенсоров содержат 4 или 5 остатков глутамата, доступных для метилирования. Как внеклеточный стимул транслируется во внутриклеточный сигнал?

Существуют две модели. 1. «Принцип ножниц»: связывание лиганда дистальными концами связанных с мембраной спиралей может индуцировать значительное перемещение трансмембранных сегментов (принцип ножниц). В несвязанном с лигандом состоянии субъединицы рецептора предположительно взаимодействуют между собой только в области первого трансмембранного сегмента. Связывание с лигандом вызывает сближение сенсорных периплазматических субъединиц, что передается сигнальным субъединицам и обеспечивает их взаимодействие между собой, а в таком виде они уже не могут взаимодействовать с CheA и стимулировать его автокиназную активность. Метилирование создает стерические препятствия для взаимодействия сигнальных доменов между собой, что снова позволяет им стимулировать автокиназную активность CheA.

2. Принцип «Пистона». Сейчас все больше и больше данных накапливается в пользу другого механизма, основанного на скольжении трансмембранных сегментов (TM) друг относительно друга. Самый аминоконцевой TM1 закреплен в мембране жестко, тогда как второй более подвижен, и при связывании лиганда скользит "вниз", т.е. в сторону цитоплазмы, что и вызывает конформационное изменение цитоплазматического сигнального домена, инактивирующее его. Вариация на эту тему – участие двух амфипатических спиралей линкерного домена в изменении конформации.

2. Наименование вопроса № 2. Регуляция хемотаксиса

Для сильных аттрактантов — сахаров (N-ацетилглюкозамина, фруктозы, галактозы, глюкозы, мальтозы, маннитола, рибозы, сорбитола и трегалозы) описано девять хеморецепторов. Два предназначены для обнаружения аминокислот (аспартата и серина). На генетической карте *E. coli* были локализованы гены подвижности и хемотаксиса, включающие такие локусы:

- *curly* (он связан с повреждением белка жгутиков и с изменением их движений, так что возможны только вращательные движения);
- *motile* (жгутики нормальны на вид, но не могут двигаться);
- *flagella* (отсутствие жгутиков, неподвижность);
- *chemotaxis* (хемотаксис отсутствует при сохранении подвижности; локус включает три гена).

У *E. coli* хемотаксис можно пронаблюдать, если вставить капиллярную трубку, заполненную аттрактантом, или репеллентом, в пробирку, содержащую бактериальные клетки в жидкой агаризованной среде. Если капилляр содержит нейтральный химикат, который ни привлекает, ни отталкивает, бактериальные клетки безразличны к нему и остаются однородно рассеянными повсюду в среде (А). Если капилляр содержит аттрактант, движение клеток направлено к устью (входному отверстию) капилляра, и, в конечном счете, клетки в него проникают (Б). Если капилляр содержит репеллент, клетки отплывают от него (В). Большинство аттрактантов – питательные вещества, такие как сахар и аминокислоты, тогда как большинство репеллентов – вредные вещества или продукты выделения, например, кислоты или спирты. Следовательно, ответ хемотаксиса важен для бактериальных клеток, поскольку обеспечивает их перемещение в среду с благоприятными условиями или удаление от вредных условий. В отсутствие аттрактантов или репеллентов, клетки движутся хаотично. В присутствии аттрактанта периоды продвижения по направлению к нему становятся более продолжительными, а периоды перемещения в другом направлении – более редкими и короткими, т.е. в целом траектория движения клеток направлена к источнику аттрактанта. Действие репеллентов противоположно, и, следовательно, клетки постепенно рассеиваются от их источника. Выявление мутаций, затрагивающих хемотаксис у бактерий, позволило установить генетические компоненты данного типа ответа. Фенотипы мутаций хемотаксиса подразделяют на пять категорий:

1. «*Специфическое отсутствие хемотаксиса*» означает, что клетки мутанта не проявляют ответ на специфический аттрактант или репеллент. Например, галактоза – аттрактант. Фенотип мутанта, который не в состоянии отвечать положительным хемотаксисом на галактозу, что и отличает его от бактерий дикого типа, демонстрирует «отсутствие хемотаксиса, специфичное для галактозы». Следствием мутации в другом гене является фенотип специфического отсутствия положительного хемотаксиса к глюкозе.

2. «*Множественное отсутствие хемотаксиса*» относится к фенотипам не способным проявлять ответ хемотаксиса на группу химически несвязанных веществ. Например, мутации в гене *tsr* приводят к неспособности мутантов отвечать на присутствие аттрактанта – аминокислоты серин или репеллентов – индола, лейцина и ацетата. Мутанты с множественным отсутствием хемотаксиса образуют четыре группы комплементации, соответственно которым определяют четыре гена – *tsr*, *tar*, *trg*, и *tap*.

3. «*Общее отсутствие хемотаксиса*» – это неспособность отвечать на какой бы то ни было аттрактант или репеллент. Не смотря на то, что у таких мутантов есть нормальные жгутики, так же как аппарат, необходимый для того, чтобы переключить направление их вращения, они не способны управлять вращением жгутиков в ответ на аттрактанты или репелленты. Мутации общего отсутствия хемотаксиса могут быть объединены в шесть групп комплементации в зависимости от гена, который является существенным для любого вида хемотаксиса: *cheA*, *cheB*, *cheR*, *cheW*, *cheY*, и *cheZ*.

4. Мутации в моторных компонентах жгутиков вызывают отсутствие хемотаксиса из-за дефектов в аппарате, который управляет переключением между направлениями вращения

жгутиков. Эти мутанты либо непрерывно движутся (плывут), либо непрерывно «падают», в зависимости от специфического типа мутации. С помощью генетического анализа мутаций в моторных компонентах были установлены три гена, необходимые для того, чтобы бактериальная клетка была способна переключаться между «плаванием» и «падением»: *fliG*, *fliM*, и *fliN*.

5. *Неподвижные мутанты* – это мутанты, которые неспособны ни «плавать», ни «падать», т.е. они неподвижны. Мутации неподвижности включают большое количество различных генов, которые необходимы для синтеза или работы жгутиков.

Анализ мутаций был важен для понимания процесса хемотаксиса у бактерий. Например, корреляция между направлением вращения жгутиков и состоянием «плаванья» или «падения» клеток была установлена при наблюдении за двумя типами мутаций в моторных компонентах жгутиков. Все гены, задействованные в хемотаксисе, были клонированы и секвенированы, и их генные продукты были идентифицированы. Хемотаксис бактерий дикого типа требует наличия ряда белков, так называемых *хемосенсоров*, каждый из которых связывается с определённым аттрактантом или репеллентом. В качестве примеров хемосенсоров можно привести галактоза-связывающий белок и переносчик глюкозы. Известно более чем 20 различных хемосенсорных белков; около половины из них связываются с аттрактантами, а другая половина – с репеллентами. Мутации в генах, кодирующих хемосенсорные белки, приводят к отсутствию хемотаксиса. Приспособительное значение хемотаксиса доказано экспериментально. Например, формы холерного вибриона с нарушенным хемотаксисом оказываются менее болезнетворными (вирулентными), чем исходные. За счет хемотаксиса к корешкам растений приближаются симбиотические или паразитические бактерии, корневые выделения иногда воспринимаются ими с расстояния до 10 см (огромное для бактерии расстояние).

Кроме хемотаксиса бактерии могут проявлять и другие поведенческие реакции:

- фототаксис, характерный для бактерий, использующих свет в качестве источника энергии;
- вискозитаксис, при котором бактерии стремятся в среду с большей вязкостью (характерен для некоторых патогенных бактерий);
- термотаксис - движение в сторону повышения или понижения температуры;
- магнетотаксис - способность некоторых бактерий плыть вдоль линий магнитного поля (в клетках таких бактерий, называемых магнетобактериями, находятся кристаллики железосодержащих минералов (например, магнетита), ориентирующиеся вдоль линий магнитного поля как стрелка компаса)

Новое необычное «электрическое» поведение бактерий *Shewanella oneidensis* обнаружили американские биологи. Оказалось, что *S. oneidensis* очень любят металлические частицы, подплывают к ним, садятся на них, снова «сбегают», активно передвигаются вблизи объекта, опять садятся. При замедленной съемке обнаружилось, что каждый раз при приближении к металлическим частицам микроорганизмы начинали активно двигаться. Бактерии демонстрировали подобное поведение и вблизи электрода батареи. При этом, как только электрод переставал работать, активное плавание прекращалось. Такое поведение бактерий получило название электрокинеза (*electrokinesis*). Вероятно, бактерии во время контакта с металлом собирали посредством химической реакции энергию, затем несколько минут активно передвигались и снова садились для «подзарядки». К сожалению, генетические основы многих поведенческих реакций бактерий изучены пока недостаточно.

3. Наименование вопроса № 3. Цитоплазматические сигнальные белки

Взаимодействие между рецепторами и переключателем жгутика осуществляется 4 белками:

♦ CheA – ГК(гистидиновая протеинкиназа)

♦ CheY – РО(регулятор ответа)

♦ CheW - "адаптор" между рецептором и CheA

♦ CheZ - белок, способствующий дефосфорилированию CheY~Ф. Пара белков CheA-CheY представляет собой двухкомпонентную регуляторную систему. CheY не является транскрипционным фактором и у него отсутствует ДНК- связывающий домен. ГК CheA функционирует в виде димера, с которым связываются два мономера CheW, и уже этот комплекс вступает в ассоциацию с димерным рецептором. В составе такого комплекса автокиназная активность резко возрастает, что усиливает перенос фосфата от CheA~Ф к CheY. CheY~Ф связывается с FliM моторно-переключательного комплекса базального тела, что приводит к вращению жгутика по часовой стрелке. CheZ предотвращает накопление CheY~Ф, стимулируя автофосфатазную активность CheY. При отсутствии аттрактанта концентрация CheY~Ф поддерживается на уровне, способствующем вращению жгутика преимущественно по часовой стрелке и отсутствию упорядоченного движения бактерии. Связывание аттрактанта с рецептором индуцирует конформационное изменение, которое передается через мембрану и подавляет автокиназную активность CheA. Концентрация CheY~Ф падает, и жгутики бактерии более продолжительное время вращаются против часовой стрелки. Поэтому клетки будут дольше двигаться прямолинейно, если они попадают в среду с более высокой концентрацией аттрактанта. Однако этот механизм не объясняет, как клетка может реагировать на постоянно возрастающую концентрацию аттрактанта.

1. 9 Лекция №9 (2 часа).

Тема: «Оперонная и регулонная организация генов».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Оперонная организация генов прокариот
2. Регулонная организация генов прокариот

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1. Оперонная организация генов прокариот

Этот тип регуляции был открыт благодаря исследованиям Ф. Жакоба и Ж. Моно, которые пытались выяснить, каким образом бактериальные клетки реагируют на изменение условий окружающей среды. В частности, изучался синтез фермента α -галактозидазы у бактерий *E. coli*. Если бактерии *E. coli* выращивать на среде с глюкозой, то α -галактозидаза не синтезируется. Если клетки перенести в среду с лактозой, то содержание фермента α -галактозидазы, участвующего в расщеплении лактозы, увеличивается в 1000 раз. Такая активация транскрипции называется индукцией. Одновременно с α -галактозидазой индуцируется синтез еще двух ферментов: α -галактозидпермеазы, обеспечивающей транспорт лактозы внутрь клетки через цитоплазматическую мембрану, и α -галактозидтрансацилазы. Установлено, что дефект в любом из трех генов, ответственных за синтез одного из этих ферментов, приводит к неспособности утилизировать лактозу.

Опероном называют группу функционально связанных между собой генов. Белки, кодируемые генами одного оперона, – это, как правило, ферменты, катализирующие разные этапы одного метаболического пути. Транскрипция генов оперона ведет к синтезу одной общей молекулы иРНК. Лас-оперон состоит из кодирующей области, представленной тремя структурными генами, ответственными за синтез ферментов; а также из промоторно-операторной области. Оператор представляет собой небольшой участок ДНК, граничащий с первым структурным геном. С оператором может связываться белок-репрессор, блокируя инициацию (начало) транскрипции. Промотор – это небольшой участок ДНК перед оператором. Он служит местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) и от него начинается транскрипция ДНК. Оператор и промотор в некоторой степени перекрываются.

Транскрипционная активность входящих в оперон генов регулируется специальным геном-регулятором, или регуляторным геном (ген R), который может располагаться рядом со структурными генами или на некотором расстоянии от них. Ген R кодирует синтез специфического белка-репрессора. Репрессор – аллостерический белок, имеющий два центра связывания: один центр узнает оператор, другой – взаимодействует с эффектором или индуктором.

Различают опероны индуцибельные и репрессибельные. Индуцибельные опероны ответственны за катаболизм лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов. В основе индукции синтеза ферментов лактозного оперона лежит механизм негативной, или отрицательной, регуляции. В отсутствие лактозы молекула репрессора, активная в свободном состоянии, связывается с оператором, закрывая при этом промотор, что препятствует связыванию с ним РНК-полимеразы и началу транскрипции структурных генов. При наличии в среде внешнего индуктора лактоза транспортируется с помощью α -галактозидпермеазы внутрь клетки и с помощью фермента α -галактозидазы превращается в аллолактозу, которая действует как внутренний индуктор. Аллолактоза связывается с репрессором, который при этом претерпевает конформационное изменение, уменьшающее его сродство к ДНК оператора, и в результате репрессор отсоединяется от λ ас-оператора.

Лактозный оперон подвержен также регуляции другого типа – позитивной, или положительной. Дело в том, что РНК-полимераза может связаться с промотором лишь тогда, когда к нему присоединен регуляторный белок БАК (белок, активирующий катаболизм), или САР (catabolite activator protein). Однако БАК может связаться с промотором только в том случае, если в клетке в достаточно высокой концентрации присутствует циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Это было установлено с использованием феномена диауксического роста (или диауксии) – при наличии в среде глюкозы и лактозы клетки бактерий вначале используют глюкозу, а затем после ее полного израсходования начинают катаболизировать лактозу. Оказалось, что глюкоза репрессирует синтез α -галактозидазы. При наличии в среде глюкозы в клетке резко снижается количество цАМФ. Это явление называют катаболитной репрессией. Оно наблюдается и в тех случаях, когда вместо лактозы используется какой-то другой углевод.

2. Наименование вопроса №2. Регулонная организация генов прокариот. Кроме индуцибельных оперонов, управляющих катаболизмом углеводов, у бактерий имеются и репрессибельные опероны. Это опероны, ответственные за синтез аминокислот аргинина, гистидина и триптофана. Максимальная транскрипция структурных генов этих оперонов достигается только при отсутствии в клетке конечных продуктов или эффекторов этих биосинтетических путей. Такие эффекторы, которыми являются конечные продукты, называют корепрессорами, а соответствующие регуляторные белки – апорепрессорами. Синтез ферментов репрессибельного оперона включается посредством дерепрессии структурных генов. Разберем строение триптофанового оперона *E. coli*. Он

состоит из пяти структурных генов, ответственных за синтез пяти ферментов, участвующих в превращении хоризмовой кислоты в триптофан, а также из промоторно-операторной области. Ген-регулятор (*trpR*) расположен на хромосоме на некотором расстоянии от оперона. Он ответственен за синтез регуляторного белка – апорепрессора, который неактивен в свободном состоянии, не может связываться с оператором и неспособен, таким образом, препятствовать началу транскрипции. Когда конечный продукт метаболического пути – триптофан – накапливается выше определенного уровня, взаимодействует с апорепрессором и активирует его. Активированный апорепрессор (апорепрессор + корепрессор) присоединяется к оператору и подавляет транскрипцию структурных генов триптофанового оперона. Синтез триптофана прекращается. Отсутствие активированного репрессора вызывает примерно 70-кратное увеличение актов инициации транскрипции. Для того чтобы понизить уровень транскрипции в присутствии триптофана в еще большей степени, в клетках бактерий *E. coli* имеется дополнительный механизм регуляции транскрипции, который называется аттенуацией, в осуществлении его принимает участие продукт гена *trpL*. В условиях избытка триптофана только одна из десяти молекул РНК-полимеразы, начавшая транскрибирование с промотора, взаимодействует со структурными генами и продолжает транскрипцию. Таким образом, действие аттенуатора проявляется в терминеции транскрипции, а сам процесс аттенуации классифицируется как регулируемая терминеция транскрипции. Аттенуация зависит не от самой аминокислоты, а от образования триптофанил-тРНК, т. е. активированной аминокислоты, присоединенной к транспортной РНК. При уменьшении внутриклеточной концентрации триптофана сначала осуществляется дерепрессия. Это значит, что образуется возможность связывания молекул РНК-полимеразы с промотором *Trp*-оперона. При более глубоком голодании снижается уровень триптофанил-тРНК и возникают условия для преодоления аттенуатора. Таким образом, и в случае индукции путем негативной регуляции (*Лас*-оперон), и в случае репрессии синтеза ферментов (*Трп*-оперон) взаимодействие репрессора с оператором приводит к подавлению транскрипции соответствующих структурных генов. Различие заключается в том, что при индукции путем негативной регуляции эффектор (индуктор), взаимодействуя с репрессором, понижает сродство репрессора к оператору, а в случае репрессии эффектор (корепрессор) повышает это сродство.

1. 1 Лекция №10 (2 часа).

Тема: «Регуляция метаболизма у эукариот».

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Регуляция метаболизма на биохимическом уровне
2. Регуляция метаболизма на генетическом уровне

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1. Регуляция метаболизма на биохимическом уровне

Живая клетка является открытой динамической саморегулирующейся системой, метаболизм которой зависит как от внутренних потребностей, так и от факторов окружающей среды. Поэтому все существующие в клетке гены экспрессируются не одновременно, а по потребности. Кроме того и активность ферментов меняется в зависимости от нужд клетки. В этом и состоит сущность регуляции метаболизма. Регуляция метаболизма осуществляется на двух основных уровнях – генетическом и биохимическом. На генетическом уровне обмен веществ регулируется путем регуляции экспрессии генов, а именно усилением или подавлением транскрипции и

трансляции. Второй уровень регуляции – биохимический осуществляется за счёт регуляции активности ферментов. Генетическая регуляция – грубый способ настройки метаболизма, биохимическая регуляция – более тонкая настройка. Молекулярной основой обоих уровней регуляции являются аллостерические ферменты и белки, имеющие обычно два типа активных центров. Один из них служит для присоединения низкомолекулярных эффекторов, которые могут влиять на проявление активности второго активного центра, путем изменения пространственной структуры белка. При регуляции ферментативной активности (биохимический уровень) – сами ключевые ферменты того или иного метаболического цикла являются аллостерическими. Они имеют два типа активных центров – каталитический (для связывания с субстратом) и эффекторный (для связывания с эффектором – активатором или ингибитором). Если фермент связывается с активатором, изменяется его конформация и, в том числе, пространственная структура каталитического центра. Это способствует облегчению связывания фермента с субстратом и усиливает ферментативную активность. Если эффектор является ингибитором, то его присоединение к эффекторному центру фермента ослабляет или делает невозможным взаимодействие субстрата с каталитическим центром и ведет к понижению или полному угнетению ферментативной активности.

2. Наименование вопроса №2. Регуляция метаболизма на генетическом уровне

В регуляции экспрессии генов (генетический уровень) также участвуют аллостерические белки. Они выступают в роли белков-регуляторов, которые связываются с ДНК в промоторной зоне гена (или оперона) в области оператора и могут либо усиливать, либо подавлять транскрипцию. Один центр белка-регулятора служит для присоединения к ДНК, второй центр – для связывания эффектора. Аллостерические белки-регуляторы выступают в роли посредников между ДНК и эффектором. Эффекторами, способными «включать» или «выключать» гены, являются: в катаболических генах (оперонах) – сам субстраты (например, углеводы), которые подлежат расщеплению, они выступают активаторами для белка-регулятора, т.е. выполняют функцию «включателей» гена; в анаболических оперонах – конечные продукты синтеза (например, аминокислоты, нуклеотиды), они выступают в роли корепрессоров для белка-регулятора и, связываясь с ним, «выключают» транскрибирование ферментов, необходимых для их собственного синтеза.

Механизмы регуляции метаболизма на генетическом уровне впервые были изучены на прокариотах (в оперонах кишечной палочки) в работах Жакоба и Моно еще в 40х-60х годах XX столетия. В настоящее время установлено, что регуляция экспрессии генов осуществляется на уровне транскрипции – при синтезе и-РНК и на уровне трансляции – при синтезе белка на рибосомах. На уровне транскрипции выявлены такие механизмы регуляции: положительный и отрицательный контроль; индукция и репрессия; аутогенный контроль; катаболитная репрессия; смешанные механизмы регуляции; регуляция посредством взаимодействия с энхансерами и сайленсерами (у эукариот). На уровне трансляции выявлены следующие механизмы: аттенуация путем образования альтернативных шпилек на и-ДНК (изучена у прокариот), регуляция трансляции на уровне сборки рибосом; регуляция трансляции с помощью факторов инициации, элонгации и терминации. Регуляция на уровне транскрипции. Положительный и отрицательный контроль регуляции работы генов (или оперонов) реализуется с помощью белков-регуляторов (R) и базируется на их природе. При положительном контроле белок-регулятор, связываясь с оператором, ускоряет сборку РНК-полимеразы и, следовательно, усиливает транскрипцию. При отрицательном контроле белок-регулятор (R) блокирует оператор, который часто перекрывается с промотором, и препятствует сборке РНК-полимеразы либо её продвижению по матричной цепи ДНК. Белки-регуляторы кодируются отдельными генами, расположенными вблизи оперона, внутри оперона среди структурных генов (при аутогенном контроле), либо далеко за пределами оперона. Индукция и репрессия. Осуществление таких механизмов регуляции экспрессии

генов, как индукция и репрессия, реализуется благодаря эффекторам. Генетические системы чутко реагируют на присутствие в клетке и окружающей среде питательных субстратов, тех или иных важных метаболитов, поэтому экспрессия «нужных» генов начинается только после появления в среде или в клетке соответствующих эффекторов – субстратов или конечных продуктов синтеза. Белки-регуляторы являются посредниками между молекулой ДНК и эффекторами, запускающими тот или иной метаболический путь. Для катаболических оперонов и генов характерна индукция. При этом эффекторами белков R являются сами субстраты (глюкоза, лактоза, глицерин и др.). Их называют индукторами и они являются эффекторами, усиливающими транскрипцию. В этом есть глубокий биологический смысл. Так, например, лактозный оперон, кодирующий три фермента катаболизма лактозы (бета-галактозидазу, пермеазу и трансацетилазу) включается только тогда, когда в среде появляется эффектор – субстрат лактоза, выступающий в качестве индуктора. Для анаболических оперонов и генов характерна репрессия. При этом эффекторами для белков-регуляторов являются конечные продукты синтеза (например, аминокислоты, нуклеотиды), которые выступают в роли корепрессоров и способны угнетать транскрипцию. Например, у *E. coli* аминокислота триптофан, накопленная клеткой в результате синтеза в избыточном количестве, как корепрессор белка-регулятора (репрессора) блокирует синтез ферментов, закодированных в 5 генах триптофанового оперона. Т.е. эффектором (корепрессором) триптофанового оперона является сам триптофан. Обобщая сказанное выше, еще раз подчеркнем: индукция характерна для катаболических оперонов, эффекторами являются субстраты, выступающие в роли индукторов; репрессия характерна для анаболических оперонов, эффекторами являются конечные продукты синтеза, выступающие в роли корепрессоров. В условиях «in vivo» положительный и отрицательный контроль почти всегда сочетаются с индукцией и репрессией, т.е. в регуляции принимают участие и белки-регуляторы и эффекторы. Поэтому выделяют 4 типа классических оперонов: 2 индуцибельных оперона – соответственно с положительным и отрицательным контролем и 2 репрессибельных оперона – также с положительным и отрицательным контролем. Рассмотрим их. Индуцибельный оперон с отрицательным контролем – сочетание отрицательного контроля и индукции. Такой тип регуляции был обнаружен в лактозном опероне *E. coli*. Регуляция осуществляется следующим образом. Если в среде нет лактозы, то белок-регулятор, выступая в качестве репрессора (отрицательный контроль), блокирует операторную зону в данном опероне и препятствует транскрибированию генов. Как только лактоза появляется в среде, она как эффектор-индуктор связывается с белком-регулятором, изменяет его конформацию и уменьшает сродство к ДНК. В результате белок-регулятор (репрессор) отпадает от оператора, что «открывает путь» для РНК-полимеразы. Последняя осуществляет транскрипцию генов, кодирующих ферменты для катаболизма (утилизации) лактозы. Таким образом, лактоза путем индукции включает собственный оперон. Индуцибельный оперон с положительным контролем – сочетание положительного контроля и индукции. Этот тип регуляции был обнаружен также у *E. coli* в мальтозном, рамнозном и арабинозном оперонах. Рассмотрим этот механизм на примере арабинозного оперона, который состоит из трех генов *araC*, *araD*, *araB*, кодирующих ферменты для превращения L-арабинозы в D-ксилозу-5-фосфат. В данном опероне белок-регулятор выполняет двойную функцию. При отсутствии арабинозы в среде белок-регулятор выступает в качестве репрессора (отрицательный контроль), присоединяется к оператору и препятствует транскрипции. При появлении субстрата арабинозы в среде, она как индуктор связывается с белком-регулятором и, меняя его конформацию, превращает в белок-активатор (положительный контроль). Этот измененный белок скользит в область промотора и, как активатор, усиливает сборку РНК-полимеразы и, следовательно, стимулирует транскрипцию. Следует отметить, что несмотря на название – «индуцибельный оперон с положительным контролем» – на самом деле здесь имеет место более сложный тип регуляции, а именно, при отсутствии индуктора оперон «закрыт»

белком-регулятором (отрицательный контроль), а появление индуктора «открывает» оперон для считывания (положительный контроль). Репрессибельный оперон с отрицательным контролем – сочетание отрицательного контроля и репрессии. Обнаружено в триптофановом опероне *E. coli*, содержащем 5 генов ферментов, участвующих в синтезе триптофана из хоризмовой кислоты (хоризмата). Это типичный анаболический оперон, подверженный регуляции по типу репрессии. Регуляция его транскрипции осуществляется следующим образом. Если в клетке недостаточно триптофана, то оперон беспрепятственно считывается РНК-полимеразой и обеспечивает продукцию ферментов для синтеза триптофана. При этом белок-регулятор имеется в клетке, но в неактивной форме – в виде апорепрессора (неполноценного репрессора). Как только в клетке накапливается избыток триптофана, он как корепрессор соединяется с апорепрессором и делает его полноценным репрессором. Присоединение репрессора к оператору вызывает блокирование транскрипции (отрицательный контроль), в результате чего прекращается синтез ферментов и самого триптофана. Репрессибельный оперон с положительным контролем – сочетание положительного контроля и репрессии. Такой тип регуляции пока не обнаружен, но предполагается, что белок-регулятор при недостатке конечного продукта в клетке выступает в роли белка-активатора (положительный контроль) и активирует транскрипцию. При накоплении конечного продукта в избытке он сам выступает в качестве корепрессора, связывается с белком-регулятором и превращает его в репрессор. Это приводит к блокированию синтеза ферментов и, как следствие, самого конечного продукта. Катаболитная репрессия является примером смешанного механизма регуляции и первоначально была обнаружена в описанном ранее лактозном опероне *E. coli* при явлении, получившем название диауксия. Это явление наблюдается в том случае, если в среде имеется несколько углеводов (например, глюкоза и лактоза) и сводится к тому, что сначала утилизируется глюкоза, как легко усвояемый субстрат, за счет вовлечения в гликолиз. При этом лактозный оперон будет заблокирован до тех пор, пока глюкоза не будет исчерпана, т.е. синтез ферментов, расщепляющих второй субстрат, репрессируется. Отсюда и название – «катаболитная репрессия». По мере утилизации глюкозы происходит дерепрессия лактозного оперона и начинается транскрипция генов катаболизма лактозы. Рассмотрим, как реализуется этот механизм. В лактозном опероне существует две системы регуляции. Первый регуляторный механизм уже был описан ранее как пример индуцибельного оперона с отрицательным контролем. Он релизуется в области оператора за счет белка-репрессора, действие которого убирается за счет связывания с индуктором лактозой. Однако этого недостаточно, чтобы началось транскрибирование генов оперона, поскольку оперон не может «включиться» до тех пор, пока с соседней областью промотора не свяжется другой специфический белок-регулятор CAP (catabolite activator protein), т.е. пока не сработает вторая система регуляции. Связывание CAP с промотором является необходимым условием присоединения РНК-полимеразы к ДНК. Однако эффектором CAP является циклический АМФ (цАМФ), который в достаточном количестве появляется только после исчерпания глюкозы. Пока в среде есть глюкоза, она вовлекается в гликолиз с образованием АТФ. Как только глюкоза исчерпается, то количество АТФ в клетке резко уменьшается, но возрастает концентрация цАМФ, который является сигналом голода. Под воздействием цАМФ белок CAP модифицируется и как активатор присоединяется к промотору, ускоряя присоединение и сборку РНК-полимеразы и, тем самым, делая возможной транскрипцию генов лактозного оперона, то есть клетка переходит на питание лактозой. Таким образом, в лактозном опероне функционирует две системы регуляции – одна на промоторе (индукция с положительным контролем), другая – на операторе (индукция с отрицательным контролем). На операторе контроль осуществляется с помощью белка-репрессора и индуктора лактозы, на промоторе «включение» оперона обеспечивается благодаря присоединению белка-регулятора CAP и его эффектора цАМФ. Аутогенный контроль (или аутогенная регуляция) осуществляется в тех оперонах, где один из структурных генов

кодирует белок с двойными функциями – и фермента и белка-регулятора. Принцип аутогенной регуляции состоит в том, что белок-регулятор управляет транскрипцией оперона и тем самым влияет на собственный синтез. То есть происходит саморегуляция оперона. Причем такой тип регуляции встречается в оперонах и с положительным и с отрицательным контролем. Это достаточно тонкая система регуляции, позволяющая приостановить или же наоборот активировать транскрипцию в соответствии с потребностями клетки на данный момент. Наиболее изучен подобный механизм на примере катаболического гистидинового оперона *hut* у сальмонелл, в котором один из генов кодирует синтез фермента, одновременно выступающего в роли белка-регулятора, притормаживающего транскрипцию. Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции. Атенуация осуществляется на уровне трансляции путем образования альтернативных шпилек на и-РНК, проходящей через рибосому. Этот тип регуляции обнаружен у *E. coli* Ч. Яновским в 1983 г. при трансляции полицистронной и-РНК, считанной с оперона *trp* содержащей гены ферментов, обеспечивающих синтез триптофана. Образованная в опероне *trp*-РНК содержит на 5'-конце лидерную последовательность, включающую повышенную долю кодонов для той аминокислоты (триптофана), синтез которой определяется данным опероном. Если в клетке недостаточно триптофана, то и-РНК своей лидерной последовательностью проходит через пептидилные и аминоацильные центры рибосомы «вхолостую», так как к месту синтеза не подходят нагруженные триптофаном т-РНК. В этом случае в лидерной последовательности, прокатанной через рибосому, за счет палиндрома формируется «шпилька», однако в области структурных генов альтернативная шпилька не образуется. Поэтому основная структурная часть и-РНК беспрепятственно транслируется с образованием ферментов, необходимых для синтеза триптофана. Если же в клетке имеется избыток триптофана и к рибосомам подходят нагруженные триптофаном т-РНК, то лидерная последовательность транслируется, зато шпилька образуется в зоне структурных генов, что приводит к преждевременной терминации трансляции. В результате этого ферменты синтеза триптофана не образуются и синтез самого триптофана прекращается.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие №1 (2 часа).

Тема: «Характеристика конструктивного метаболизма»

3.1.1 Задание для работы:

1. Оценить скорость конструктивного обмена у *E. coli*.
2. Рассчитать полученные данные по формуле.

3.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Конструктивный метаболизм (биосинтезы) — поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клеток; это процесс, связанный с потреблением свободной энергии, запасенной в химической форме в молекулах АТФ или других богатых энергией соединений. Метаболические пути конструктивной и энергетической направленности состоят из множества последовательных ферментативных реакций и могут быть разделены на три этапа. На начальном — воздействию подвергаются молекулы, служащие исходными субстратами. Иногда эту часть метаболического пути называют периферическим метаболизмом, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, — периферическими. Последующие превращения включают ряд ферментативных реакций и приводят к образованию промежуточных продуктов, или метаболитов, а сама цепь превращений

объединяется под названием промежуточного метаболизма. Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей используются для построения вещества клеток, а энергетических - выделяются в окружающую среду. Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием, которое есть результат способности этих форм жизни использовать в качестве источников энергии и исходных субстратов для построения веществ тела самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов, воздействующих на исходные субстраты и видоизменяющих их молекулы в направлении, позволяющем им далее метаболизироваться по каналам промежуточного метаболизма. В отличие от периферического промежуточный метаболизм прокариот не отличается существенным разнообразием, хотя сравнительно с таковым эукариотных организмов он состоит из большего числа вариантов.

Определение микробиологическим методом общего содержания кобаламинов в виде их цианоформ проводится с помощью тест-культуры *Escherichia coli* 113-3 по Каноп-кайте (1978) в модификации. Штамм *E. coli* 113-3 является ауксотрофом по кобаламину. Кобаламин необходим бактерии для синтеза метионина. Метод основан на том, что в определенном диапазоне количество кобаламина в среде пропорционально интенсивности роста бактерии, которую измеряют нефелометрически. Чувствительность метода: 2—4 нг витамина B12 в образце. Культуру *E. coli* 113-3 поддерживают, выращивая в течение 24 ч при 37 °C в пробирках со скошенной агаризованной средой состава (г · л⁻¹): триптон — 6,0; K₂HPO₄ — 0,2; FeSO₄·7H₂O — 0,005; L-аспарагин — 0,2; глицерин — 2,0; цианкобаламин — 0,0001; агар — 15,0; вода дистиллированная, pH 7,0. Культуру хранят при 6 °C. Частота пересева — 1 раз в 3 мес. Для определения витамина готовят основную среду (ОС) состава (г*л⁻¹): глюкоза — 2,0; K₂HPO₄ — 7,0; KH₂PO₄ — 3,0; натрий лимоннокислый — 0,5; (NH₄)₂SO₄ — 1,0; MgSO₄ · 7H₂O — 0,1; NaCl — 0,5; NaN₂ — 0,01; вода дистиллированная, pH 6,8—7,0.

Для получения калибровочной кривой используют стандартный водный раствор витамина B12 (цианкобаламина, CN-Cbl) с концентрацией 5 · 10⁵ мкг · мл⁻¹. За сутки до проведения опыта готовят посевной материал. Для этого *E. coli* (штамм 113-3) пересевают с агаризованной среды в пробирку, содержащую 5 мл ОС и 5 мл стандартного раствора цианкобаламина, и выращивают 20—24 ч при 37 °C. В испытуемом образце кобаламины предварительно переводят в раствор и стабилизируют в виде нитритной формы. Для этого к 1 мл хорошо перемешанной культуры в пробирке, градуированной на 10 мл, добавляют 4 мл дистиллированной воды и 2 мл 0,1%-го раствора NaNO₂. Затем доводят pH до 4-5 с помощью 0,1 н. раствора HCl и нагревают ее в кипящей водяной бане в течение 15 мин. Пробирки охлаждают, растворы нейтрализуют сухим NaHCO₃ (pH 7,0), объем жидкости доводят дистиллированной водой до 10 мл. Образцы хранят в холодильнике.

Исследуемые образцы могут содержать метионин, который также поддерживает рост *E. coli* 113-3, поэтому параллельно рекомендуется проводить контрольный анализ образцов, в которых кобаламины предварительно разрушены. Для этого в подготовленные образцы добавляют NaOH до концентрации 0,1 н., нагревают их 20 мин на водяной бане, охлаждают и нейтрализуют 0,1 н. HCl. Для получения калибровочной кривой в широкие пробирки со стерильной ОС (5 мл) добавляют стандартный стерильный раствор CN-Cbl (5·10⁻⁵ мкг · мл⁻¹) в количестве: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мл, что соответствует 0,025; 0,05; 0,075 и 0,1 мкг CN-Cbl. Подготовленные опытные образцы добавляют в количестве от 0,5 до 4,0 мл (например, по 0,5; 2,0 и 4,0 мл). Объем среды в пробирках доводят стерильной

дистиллированной водой до 10 мл. Культуру (0,1 мл), используемую в качестве посевного материала, суспендируют в 10 мл 0,9%-го стерильного раствора NaCl. Посевной материал вносят в количестве 1 % (по объему). Выращивание проводят в течение 20—24 ч при 37 °С. Рост определяют, измеряя оптическую плотность при 540 нм.

Для проведения спектрофотометрического определения кобаламины освобождают из клеток в водный раствор путем гидролиза, переводят в гидроксильные производные и измеряют поглощение при длине волны максимального поглощения соответствующих производных кобаламина. Полученное значение пропорционально концентрации кобаламина. Чувствительность метода — 10—100 мкг кобаламина в пробе. Клетки из 200 мл 72-часовых культур вариантов 3 и 4 собирают центрифугированием (6 тыс. г, 15 мин), количественно помещают в колбы на 250 мл путем суспендирования клеток в подкисленной до pH 4,6—5,0 дистиллированной воде (~30-кратный объем по отношению к объему сырой биомассы). Корриноиды экстрагируют путем нагревания суспензии в кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения осадок отделяют центрифугированием (6 тыс. г, 15 мин). Супернатант должен иметь pH 4,6—5,0. В суммарном препарате могут присутствовать разные производные кобаламина, различающиеся по коэффициентам экстинкции и максимумам поглощения. Поэтому корриноиды переводят в форму гидроксильных производных путем помещения раствора под лампу накаливания (60 Вт) на расстоянии 25 см на 30 мин. Измеряют конечный объем раствора. Определяют поглощение при длине волны, соответствующей максимуму поглощения гидроксикобаламина (ОН-СЫ) — 530 нм.

3.1.3 Результаты и выводы

Суммарное содержание корриноидов в 1 л культуры рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A_{530} \cdot V_1 \cdot 10^3}{K \cdot V_2},$$

: где С — содержание корриноидов, ммоль • л-1 исследуемого раствора; A_{530} — оптическая плотность при $\lambda = 530$ нм, толщина кюветы 1 см; К — коэффициент миллимолярной экстинкции (для ОН-СЫ К= 56); V_1 — объем раствора (гидролизата), мл; V_2 — объем культуры, из которой собрана биомасса, мл.

Для выражения содержания корриноидов в весовых единицах необходимо использовать величины их молекулярной массы. Для ОН-СЫ она равна 1341. Однако большая часть корриноидов *P. freudenreichii* представлена аналогом кобаламина — кобинамидом, не содержащим а-лиганд (нуклеотид с основанием 5,6-диметилбензимидазол, 5,6-ДМБ). Молекулярная масса производных этого аналога — 1000—1100. Поэтому обычно за несколько часов до измерения в культуру вводят 5,6-ДМБ (10 мг • л-1). Интенсивность и характер пропионовокислого брожения (ПБ) оценивают по количеству и соотношению выделяемых бактерией в культуральную жидкость пропионовой и уксусной кислот. Качественное и количественное определение летучих кислот проводят методом газожидкостной хроматографии.

2.2 Практическое занятие 2 (2 часа).

Тема: «Регуляция вторичного метаболизма. Регуляция синтеза АТФ у микроорганизмов»

2.1.1 Задание для работы:

1. Изучение процесса нитрификации путем определения продуктов энергетического метаболизма нитрифицирующих бактерий
2. Наблюдение динамики роста клеток.

2.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Нитрифицирующие бактерии относятся к группе хемолитоавтотрофов, получающих энергию для своего роста за счет окисления неорганических соединений азота. Хемолитоавтотрофы образуют клеточный материал из CO_2 , а необходимую для этого энергию и восстановительные эквиваленты в виде НАД(Ф)Н извлекают при окислении строго определенного для каждой группы субстрата. Процесс нитрификации, который протекает в почве, навозе, воде и приводит к окислению аммиака до NO_2 и затем до NO_3 , с давнего времени известен в сельскохозяйственной практике и в процессе приготовления селитры для изготовления пороха. До середины XIX в., т. е. до работ Л. Пастера, эти превращения объясняли чисто химическими явлениями. Пастер предположил участие в них микроорганизмов. К бактериям, осуществляющим I фазу нитрификации, относятся представители четырех родов: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*. Дальнейшее окисление NO_2 до NO_3 выполняют нитритоксилирующие бактерии: *Nitrospina*, *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*. Бактерии обеих фаз представляют собой грамотрицательные, довольно мелкие микроорганизмы. Морфологическое изучение нитрификаторов проводится с использованием фазово-контрастной и электронной микроскопии. Метаболизм нитрифицирующих бактерий характеризуется способностью бактерий использовать для конструктивных процессов CO_2 как единственный источник углерода; ассимиляция углекислоты идет через фосфорилированные продукты рибулозоди-фосфатного цикла, синтез мономеров — через цикл трикарбоновых кислот, который у них, как и у многих облигатных хемоавтотрофов, не замкнут. Особенности регуляции обмена мономеров обуславливают токсическое действие ряда органических веществ на нитрифицирующие бактерии. Синтез НАДН и получение энергии, необходимой для ассимиляции CO_2 , происходят в результате окисления неорганических доноров электронов NH_4^+ и NO_2^- . При этом, поскольку место входа электронов в дыхательную цепь находится на уровне цитохрома с у аммонийоксиляющих и цитохрома а₃ у нитрит-оксилирующих бактерий, часть аккумулированной бактериями энергии используется на осуществление обратного транспорта электронов против термодинамического градиента для восстановления НАД⁺. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал пары НАДН/НАД⁺ -0,32 В, тогда как стандартные потенциалы пар $\text{NO}_3^-/\text{NH}_2\text{OH}$ и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ равны соответственно +0,066 В и +0,42 В, поэтому для восстановления 1 моль НАД⁺ такими донорами с высоким окислительно-восстановительным потенциалом необходимо затратить энергию около 75 и 143 кДж — это может быть достигнуто за счет гидролиза 3 и 5 молекул АТФ соответственно. В связи с тем что в бактериях имеется всего один пункт генерирования энергии, значительная часть которой используется для восстановления НАД⁺ против термодинамического градиента, клетки нитрификаторов растут довольно медленно, минимальное время их удвоения — около 24 ч.

Микроорганизмы и их культивирование. В работе используют двух представителей нитрификаторов I фазы — *Nitrosomonas* sp. и *Nitrosospira* sp. и одного представителя II фазы — *Nitrobacter winogradsky*. Энергетическим субстратом и источником азота для нитрифицирующих бактерий I фазы является NH_4^+ . Эти микроорганизмы культивируют в среде Виноградского (для I фазы — среда 1) или на среде Сориано и Уокера (среда 2).

Среда 1 (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0 (стерилизуют отдельно); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; NaCl — 2,0; FeSO_4 — 0,05; CaCO_3 — 5,0; среда 2 (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; KH_2PO_4 — 0,2 (стерилизуют отдельно); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04; Фенилдиметилсульфоний — 0,0005 (стерилизуют отдельно); 1 мл 0,05%-го раствора фенолового красного. Среда стерилизуют при 1 атм, после чего pH в них доводят до 7,5—7,8 с

помощью 5%-го раствора NaHCO_3 , а в среду 2 вносят также 1 мл стерильного раствора микроэлементов.

Как видно при сравнении сред 1 и 2, они включают одни и те же основные компоненты: фосфор, магний, железо, кальций, однако кальций, введенный в среду 1 в виде карбоната, определяет мутность этой среды (среда 2 прозрачна) и регулирует постоянно меняющийся в процессе культивирования pH. При выращивании нитрификаторов на среде Сориано и Уокера происходит быстрое подкисление среды за счет образования возрастающих количеств нитритов. Уменьшение pH в этом случае можно отметить с помощью универсального индикатора. Более того, добавленный при посеве индикатор феноловый красный вызывает при подкислении среды изменение цвета культуральной жидкости от сиреневатых до желтоватых оттенков. Аммонийоокисляющие бактерии чувствительны к подкислению среды, поэтому для сохранения их дальнейшего роста на среде Сориано и Уокера следует с помощью 0,1%-го NaHCO_3 ежедневно поддерживать pH в нужных пределах (7,5—7,8).

Энергетическим субстратом и источником азота для возбудителя II фазы нитрификации является N_2O . Для культивирования *Nitrobacter winogradskyi*, представляющего эту группу микроорганизмов, используются также среда Виноградского (для II фазы — среда 3) и среда Ватсона и Вотербари (среда 4). Среда 3 (г/л): NaN_2O — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5 (стерилизуют отдельно); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; NaCl — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; Na_2CO_3 — 1,0. Среда 4 (г/л): NaN_2O — 0,07; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,0006; $\text{KH}_2\text{P}_4\text{O}_7$ — 0,02 (стерилизуют отдельно). Среда стерилизуют при 1 атм 30 мин, после стерилизации pH сред доводят до 7,5 с помощью 5%-го NaHCO_3 , а в среду 4 вносят 1 мл стерильного раствора микроэлементов (по Пфеннигу и Липперту). Клетки *Nitrobacter winogradskyi*, культивируемые в этих средах как представители II фазы нитрификации, в отличие от аммонийоокисляющих бактерий не производят при росте заметного сдвига pH среды.

Приготовленные среды разливают по 100 мл в качалочные колбы на 750 мл, стерилизуют, вносят по 10 мл соответствующей бактериальной суспензии 5-7-суточного возраста и выращивают на качалке. Некоторое количество среды всех вариантов оставляют незасеянной для определения исходного количества субстратов. Микроорганизмы культивируют на качалке при 30 °C в течение 5—7 сут. Жидкие культуры нитрифицирующих бактерий поддерживают в темноте при 15 °C и пересевают каждые 4—6 мес. Для аммонийоокисляющих бактерий используют среду, содержащую 0,001%-й индикатор феноловый красный, 0,5 М HEPES-буфера (pH 7,8—8,0) и соответствующие соли. Через 6—8 нед цвет среды изменится с красного на желтый, указывая на окисление большей части аммония, поэтому в среду вносят дополнительное количество аммония и доводят pH до нужного значения. При поддержании нитритоокисляющих бактерий периодически анализируют содержание нитритов и при уменьшении их количества в среду вносят новую порцию NaN_2O до нужного уровня. Перед засевом в опыт культуру инкубируют при 25 °C в течение нескольких дней на свежей среде.

В процессе роста культур изучают динамику окисления бактериями неорганических энергодающих субстратов. Регистрируют изменение pH в случае нитрификаторов I фазы. Определяют сначала наличие (качественные реакции), а при получении положительного ответа — количество NH_3 . Изучение показателей энергетического обмена нитрификаторов проводят в культуральной жидкости после отделения клеток центрифугированием при 6 тыс. g. Полученные данные сравнивают с исходными уровнями окисляемых субстратов, которые определяют в средах, не содержащих посевного материала. Морфологическое изучение нитрифицирующих бактерий проводят с использованием фазово-контрастной микроскопии. *Nitrosomonas* sp. — это мелкая, овальная палочка, почти кокковидная; ее размеры 0,6–1 x 0,9–2 мкм, размножается делением пополам. *Nitrosospira* sp. — также представитель нитрификаторов I фазы, в чистой культуре имеет вид палочковидных клеток, которые, как показывают электронно-микроскопические исследования, представляют собой плотно свернутые спирали нитей диаметром 0,3—0,4 мкм.

Определение NO_2^- . Количество NO_2^- образуемого клетками *Nitrosomonas* и *Nitrosospira*, определяют в 4-, 6- и 8-суточных культурах.

Качественная реакция на присутствие NO_2^- . На белой пластинке I каплю реактива Грисса смешивают с 1 каплей исследуемой жидкости. При наличии NO_2^- развивается интенсивное малиновое окрашивание.

Колориметрический метод определения NO_2 с а-нафтиламином и сульфаниловой кислотой основан на диазотировании сульфаниловой кислоты присутствующими в пробе нитритами с образованием красно-фиолетового азокрасителя. Чувствительность метода 20—100 мкг/мл. В анализируемой пробе не должны присутствовать сильные окислители и сильные восстановители.

Реактивы: сульфаниловая кислота, 0,6%-й раствор (растворяют 6 г сульфаниловой кислоты в 750 мл горячей дистиллированной воды; к полученному раствору добавляют 250 мл ледяной уксусной кислоты); а-нафтиламин, 0,6%-й раствор (растворяют 1,2 г а-нафтиламина в дистиллированной воде, прибавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводят до 200 мл водой).

Ход определения. Берут 1 мл исследуемого образца и доводят до 45 мл водой в мерной колбе на 50 мл. Прибавляют 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и тщательно перемешивают. Через 5 мин прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора а-нафтиламина, смесь снова перемешивают и доводят до метки водой. Затем образцы колориметрируют на ФЭК — светофильтр зеленый, $X = 520$ нм, кювета 1,0 см. Полученная окраска нестойкая. Концентрацию NO_2 определяют по формуле $\text{CN}_0 - (\text{мкг/мл}) = C - 50/K$, где C — концентрация NO_2 в мкг/мл, определенная по калибровочной кривой, составленной на основе различных концентраций NO_2 (от 20 до 100 мкг/мл); V — объем пробы, взятой для определения (50 — объем, до которого разбавляется проба). Для определения количества NO_2 применяют также модификацию этого метода, в которой вместо а-нафтиламина используют так называемую кислоту Клеве (1-нафтиламин-7-сульфоновую кислоту).

Определение NO_3 . Колориметрическое определение NO_3 . Определение основано на образовании желтого соединения в результате реакции нитратов с фенолдисульфоновой кислотой. Чувствительность метода от 50 до 250 мкг/мл NO_3 .

Реактивы. Фенолдисульфоная кислота: растворяют 25 г фенола (неокрашенного) в 150 мл конц. H_2SO_4 . Прибавляют 75 мл дымящей H_2SO_4 (олеум с 15 % SO_3), тщательно перемешивают и нагревают с обратным холодильником в течение 2 ч на кипящей водяной бане.

Ход определения. 2 мл образца досуха упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. После охлаждения прибавляют 1 мл фенолдисульфонового реактива и растирают осадок стеклянной палочкой. Через 5 мин прибавляют 15 мл 10%-го раствора NaOH , при этом жидкость окрашивается в желтый цвет. Полученный раствор помещают.

Реактивы. Реактив Несслера: растворяют 100 г HgI_2 и 70 г KI в небольшом количестве бидистиллята и смешивают с раствором NaOH (100 г NaOH в 500 мл H_2O). Смесь доводится бидистиллятом до 1 л и отстаивается 4 ч. Тартрат Na-K (сегнетова соль), 50%-й раствор: растворяют 50 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в бидистилляте, доводят до 100 мл и добавляют 0,5 мл реактива Несслера. Раствор применяют после осветления.

Ход определения. К 1 мл образца в 25-миллилитровой мерной колбе прибавляют 0,2 мл 50%-го раствора сегнетовой соли, 10 мл воды, 2 мл реактива Несслера, доводят до метки и перемешивают. Через 10 мин колориметрируют; светофильтр фиолетовый, $X = 400—425$ нм, кювета 1 см. Концентрацию NH_4 (мкг/мл) определяют по формуле $\text{СШ}+4=C-25/K$,

где C — концентрация NH_4 (мкг/мл), определенная по калибровочной кривой, составленной на основе концентраций NH_4Cl от 10 до 50 мкг/мл NH_4 ; V — объем пробы, взятой для анализа, мл; 25 — объем пробы, мл.

2.1.3 Результаты и выводы

Оформление результатов. На основании изучения динамики содержания соединений азота в среде культивируемых бактерий в совокупности с данными об автотрофности нитрификаторов (что следует из состава сред, в которых отсутствуют источники органического углерода) делается вывод об участии этих соединений в процессах получения энергии и восстановительных эквивалентов.

2.3 Практическое занятие 3 (2 часа).

Тема: «Регуляция синтеза ферментов у микроорганизмов»

2.3.1 Задание для работы:

1. Определить протеолитическую, амилазную и антибиотическую активность в культурах *Streptomyces fradiae* при росте на средах разного состава.

2.3.2 Краткое описание проводимого занятия

Ферменты микроорганизмов, которые уже получают промышленным путем, являются главным образом внеклеточными, т.е. ферментами, локализованными с внешней стороны клеточной мембраны. Преимущество получения внеклеточных ферментов (экзоферментов) состоит в легкости отделения от среды и очистки. Это делает их производство более дешевым, чем получение эндоферментов. Функция большинства экзоферментов заключается в расщеплении высокомолекулярных субстратов с превращением их в форму, в которой они могут поглощаться клетками микроорганизмов. В качестве экзоферментов микроорганизмы чаще всего образуют гидролазы: протеазы (протеиназы и пептидазы), амилазы, декстраназы, целлюлазы и ряд других. Помимо ферментов многие микроорганизмы синтезируют антибиотики. Ход выполнения задачи. Микроорганизмы и их культивирование. В работе используют стрептомицет *Streptomyces fradiae* (штамм № 25 из коллекции кафедры микробиологии МГУ). Этот штамм образует комплекс экзоферментов, который включает по крайней мере пять протеиназ, две пептидазы и α -амилазу. Образование отдельных экзоферментов *S. fradiae* зависит от условий роста этой бактерии. *S. fradiae* помимо экзоферментов выделяет в культуральную жидкость антибиотик тилозин, который активен против грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий, и применяется в животноводстве. Культуру *S. fradiae* поддерживают на твердой среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт — 10,0; крахмал растворимый — 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,0; NaCl — 3,0; CaCO_3 — 2,0; агар — 20,0; вода водопроводная — до 1 л. Навеску крахмала растворяют отдельно в небольшом объеме водопроводной воды при слабом нагревании и вносят в общий объем среды. Начальное значение pH доводят до 7,5—8,0 с помощью 1 н. NaOH и затем вносят навеску агара. Колбу с готовой средой ставят на кипящую водяную баню. После того как агар расплавится и среда станет гомогенной, ее разливают в пробирки (по 1/3 их объема) и стерилизуют в автоклаве при 1,0 атм. Культуру *S. fradiae* выращивают на скошенном агаре в течение 5 сут в термостате при 30 °С и хранят в холодильнике при 4 °С. Для получения посевного материала используют жидкую среду следующего состава (г/л): кукурузный экстракт — 10,0; крахмал растворимый — 15,0; KH_2PO_4 — 0,45; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; NaCl — 2,0; ZnSO_4 — 0,02; MgSO_4 — 0,9; CaCO_3 — 5,0; вода водопроводная — до 1 л. Крахмал до внесения в среду готовят, как описано выше. Начальное значение pH среды доводят до 7,5—8,0 с помощью 1 н. NaOH, после чего разливают по 100 мл в качалочные колбы объемом 750 мл, закрывают их ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. Посев проводят изогнутой под прямым углом бактериологической иглой (крючком), перенося стрептомицет из пробирки (хранящейся в холодильнике) вместе с блочком твердой среды в колбу с жидкой средой. Колбы помещают на качалку (200 об/мин) и выращивают культуру при 30 °С в течение 3 сут. Выросший посевной материал вносят в разные варианты опытной среды (см. ниже). В качестве посевного материала можно также использовать споры *S. fradiae*, полученные выращиванием стрептомицета в пробирках на твердой питательной среде в течение 5 сут. Споры смывают с поверхности питательной среды в пробирке стерильной водопроводной водой или жидкой питательной средой (3—5 мл), используемой для получения посевного материала, и вносят в опытные варианты питательных сред. Для опыта используют среду следующего состава (г/л): кукурузный экстракт — 10,0; крахмал растворимый — 15,0; KH_2PO_4 — 0,45; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; NaCl — 2,0; ZnSO_4 — 0,02; MgSO_4 — 0,9; CaCO_3 — 5,0. К основной среде (контроль)

добавляют один из следующих субстратов (г/л): глюкоза — 10,0; соевая мука — 10,0; роговая мука — 5,0; рыбная мука — 5,0; фибрин — 5,0; шерсть — 5,0 (шерсть измельчают бритвой на мелкие фрагменты длиной около 1 мм); вода водопроводная — до 1 л. Крахмал до внесения в среду готовят, как описано выше. Начальное значение pH среды доводят до 7,5—8,0 с помощью 1 н. NaOH. Затем среду разливают по 100 мл в качалочные колбы объемом 750 мл, закрывают их ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати. При приготовлении среды с глюкозой этот субстрат стерилизуют отдельно в виде 50%-го водного раствора в автоклаве при 0,5 ати и добавляют к стерильной среде перед посевом в количестве 2 мл на 100 мл среды.

Каждый студент использует в работе колбу с одним вариантом опытной среды (т. е. с глюкозой, соевой, роговой, рыбной, мукой фибрином или шерстью) и в качестве контроля — вторую колбу с основной средой, не содержащей ни один из перечисленных субстратов. В колбы с опытной и основной средой вносят посевной материал, полученный на жидкой (5 % по объему) или твердой питательной среде (1 % по объему). После посева колбы помещают на качалку (200 об/мин) и выращивают культуры при 30 °С в течение 4 сут.

В качестве тест-культуры при определении образования антибиотика тилозина *S. fradiae* используют культуру *Bacillus subtilis*, штамм № 6633, из коллекции кафедры микробиологии МГУ. *B. subtilis* выращивают на 2%-м МПА, pH 7,0—7,2, смывают со скошенного агара дистиллированной водой и стерильно засевают данной суспензией клетки матрасы с 2%-м МПА. Бактерии выращивают при 37 °С в течение 5—7 сут. Делают смыв клеток с твердой среды матраца дистиллированной водой и полученную суспензию пастеризуют при 80 °С в течение 10 мин. Данную суспензию можно использовать на протяжении 6 мес при температуре хранения не более 5 °С.

Для построения калибровочной кривой к 5 мл 50%-го раствора глицерина добавляют ОД; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мл жидкой культуры стрептомицета и после тщательного перемешивания измеряют оптическую плотность полученных суспензий, как указано выше. Затем каждую пробу фильтруют через бумажный фильтр, предварительно доведенный до постоянной массы при 105 °С, и промывают биомассу на фильтре физраствором. Фильтр с биомассой доводят до постоянной массы высушиванием в сушильном шкафу при 105 °С. Сухую биомассу рассчитывают по разности массы фильтра до и после фильтрования. Калибровочную кривую строят, откладывая на оси ординат показания спектрофотометра, а на оси абсцисс — количество биомассы (мг).

Определение растворимого белка в супернатанте. Определение белка проводят по методу Бредфорд. В качестве красителя используют кумасси ярко-голубой G-250. Содержание белка в пробе определяют по калибровочной кривой, которую строят по оптической плотности бычьего сывороточного альбумина (БСА). После построения калибровочной кривой проводят определение белка в пробе супернатанта. Для этого к раствору, содержащему от 30 до 500 мкг белка в 1 мл, добавляют 2,0 мл раствора красителя и тщательно перемешивают. Оптическую плотность при 595 нм измеряют в кюветах с длиной оптического пути 1 см не раньше, чем через 5 мин, и не позже, чем через 1 ч после смешивания реагентов. Для сравнения используют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл 0,02 М трис-HCl буферного раствора (pH 7,8) и 2,0 мл раствора красителя.

Определение протеолитической активности. Метод основан на гидролизе окрашенного нерастворимого аналога белка протеолитическими ферментами, находящимися в исследуемом растворе, с последующим определением количества высвободившегося в результате гидролиза белка пигмента. В качестве окрашенного

аналога белка применяют казеин, окрашенный римазолом ярко-голубым, азоказеин, азоколлаген и другие субстраты.

Для определения протеолитической активности с белком, окрашенным римазолом ярко-голубым, 500 мг этого субстрата помещают в фарфоровую ступку, растирают в 5—10 мл 0,02 М трис-НС1 буфера (рН 7,5— 7,8) до получения однородного материала и постепенно, с растиранием, добавляют буфер до объема 40 — 50 мл. Затем содержимое переносят в мерную колбу на 100 мл, остатки белка смывают буфером со стенок фарфоровой ступки, количественно переносят в мерную колбу, доводят буфером объем до 100 мл и получают 0,5%-й раствор окрашенного белка. В пробирку наливают 1 мл раствора окрашенного белка, добавляют 0,5 мл 0,2 М трис-НС1 буфера и 0,5 мл опытной пробы (культуральной жидкости), которая разводится в зависимости от содержащегося в ней белка. Пробирки инкубируют в ультратермостате при 37 °С 10 мин, после чего содержимое фильтруют через мембранный фильтр «Сынпор № 2» с размером пор 2,5 мкм. В фильтрате спектрофотометрически определяют количество высвободившегося в результате гидролиза белка красителя при $\lambda = 595$ нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Для сравнения используют контрольную пробу, содержащую 1 мл субстрата, 0,5 мл 0,2 М трис-НС1 и 0,5 мл дистиллированной воды.

Определение амилалитической активности. Амилаза, образуемая *S. fradiae*, гидролизует 1,4-а-связи в амилозе и амилопектине, из которых состоит крахмал. Активность амилазы определяют по методу Смита и Роя в модификации Маннинг и Кемпбелл. Метод основан на фотометрическом определении динамики изменения окраски крахмала с йодом под действием фермента.

Реактивы: 0,1 н. ацетатный буфер (рН 5,0); свежеприготовленный 1%-й раствор растворимого крахмала (навеску крахмала растворяют на горячей водяной бане, после чего фильтруют) в 0,1 н. ацетатном буфере (рН 5,0); 0,5 М раствор CaCl_2 ; 1,0 н. раствор HCl ; 0,3%-й раствор йода в 3%-м растворе KI . В мерную пробирку А на 25 мл (опыт) наливают 0,2 мл 1%-го раствора субстрата (крахмала); 0,5 мл 0,5 М CaCl_2 и 1,5 мл 0,1 н. ацетатного буфера. Те же количества реактивов добавляют в контрольную пробирку Б. Обе пробирки выдерживают при 40 °С в течение 5 мин. Затем добавляют 1 мл раствора фермента (культуральной жидкости) в опытную пробирку А, быстро перемешивают и выдерживают 15 мин при 40 °С. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 1 н. HCl (для остановки реакции). После этого в пробирку Б добавляют 1 мл раствора фермента (культуральную жидкость). Далее в обе пробирки добавляют 0,1 мл раствора йода. Объем жидкости в пробирках А и Б доводят до 25 мл дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Оптическую плотность измеряют на ФЭК (фильтр №7- оранжевый) или спектрофотометре при $\lambda = 610$ нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. В качестве контроля используют дистиллированную воду. Действие фермента учитывают по разнице окраски в контроле и опыте ($B - A$). Активность фермента (E) выражают в условных единицах в 1 мин на 1 мл культуральной жидкости (к.ж) с учетом разведения ($E/\text{мин} \cdot \text{мл к.ж}$) и на 1 мг белка культуральной жидкости в 1 мин с учетом разведения ($E/\text{мин} \cdot \text{мг белка к.ж}$):

$$E = \frac{(B - A)25}{15 \text{ мин}}.$$

2.1.3 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результаов.

2.4 Практическое занятие 4 (2 часа).

Тема: «Регуляция аэробного дыхания у микроорганизмов»

2.4.1 Задание для работы:

1. Сравнить параметры роста дрожжей, их морфологические и физиолого-биохимические особенности при культивировании в аэробных условиях аэрации.

2.4.2 Краткое описание проводимого занятия

Микроорганизмы и условия культивирования. В работе используют разные расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: пекарские, винные, спиртовые, пивные. Посевной материал выращивают в пробирках на скошенном сусло-агаре (2 % агара) в течение 2 сут при 30 °С. Затем биомассу смывают стерильной водой и переносят по 3—4 мл в каждый сосуд для культивирования.

Дрожжи для опыта выращивают на среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0; KH_2PO_4 — 1,0; KC1 — 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,2; CaCl_2 — 0,05; дрожжевой автолизат — 50 мл; pH 6,0. Вода водопроводная. Каждый студент готовит 750 мл среды, разливает ее по 150 мл в 2 качалочные колбы (объем колбы 750 мл) и в 3 флакона (объем флакона 250 мл). Среда стерилизуют при 1 атм. Отдельно готовят необходимое количество 50%-го раствора глюкозы и стерилизуют его при 0,5 атм. Перед посевом во все опытные сосуды вносят стерильный раствор глюкозы из расчета: 2 % (по массе) — для аэробного культивирования и 6 % (по массе) — для анаэробного культивирования. Посевной материал в количестве 3—4 млн клеток (см. выше) добавляют в каждый сосуд для культивирования. Выращивание дрожжей в аэробных условиях (1-й вариант) проводят при интенсивной аэрации. Для этого колбы помещают на качалку.

Продолжительность эксперимента 96 ч. Температура культивирования - 25- 30 °С. Периодически (раз в сутки) из культуральных сосудов (из колбы и флакона без затвора) стерильно отбирают пробы для анализов, одновременно флакон с затвором взвешивают. Концентрацию дрожжей в культуральной среде определяют нефелометрически, используя кювету с длиной оптического пути 0,5 см и зеленый светофильтр № 6 ($\lambda = 540$ нм). Для перехода от показаний ФЭК к количеству клеток строят калибровочную кривую зависимости между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема. Для ее построения готовят 5—6 суспензий дрожжей разной плотности. В этом случае можно воспользоваться оставшимся инокулятом либо сделать дополнительный смыв клеток со скошенного сусло- агара. Оптическую плотность каждой суспензии измеряют на ФЭКе. Наиболее точные результаты получаются при работе с суспензиями, которые дают показания на средней шкале прибора — от 0,1 до 0,7 D. Затем в каждой суспензии подсчитывают число клеток дрожжей, пользуясь камерой Горяева. Результаты подсчета записывают в табл. Количество клеток дрожжей в 1 мл соответствующей суспензии вычисляют по

$$M = a \cdot 1000 / h \cdot s,$$

формуле:

где M — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число клеток в квадрате сетки; h — глубина камеры (0,1 мм); s — площадь квадрата сетки (0,04 мм²); 1000 мм² = 1 мл. Тогда количество клеток дрожжей в 1 мл суспензии = $a \cdot 25 \cdot 10^4$.

1.4 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результатов.

2.5 Практическое занятие 5 (2 часа).

Тема: «Регуляция анаэробного дыхания у микроорганизмов»

2.5.1 Задание для работы:

1. Сравнить параметры роста дрожжей, их морфологические и физиолого-биохимические особенности при культивировании в анаэробных условиях.

2.5.2 Краткое описание проводимого занятия

В работе используют разные расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: пекарские, винные, спиртовые, пивные. Посевной материал выращивают в пробирках на скошенном сусло-агаре (2 % агара) в течение 2 сут при 30 °С. Затем биомассу смывают стерильной водой и переносят по 3—4 мл в каждый сосуд для культивирования.

Дрожжи для опыта выращивают на среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0; K_2HPO_4 — 1,0; KCl — 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,2; CaCl_2 — 0,05; дрожжевой автолизат — 50 мл; pH 6,0. Вода водопроводная. Каждый студент готовит 750 мл среды, разливает ее по 150 мл в 2 качалочные колбы (объем колбы 750 мл) и в 3 флакона (объем флакона 250 мл). Среда стерилизуют при 1 атм. Отдельно готовят необходимое количество 50%-го раствора глюкозы и стерилизуют его при 0,5 атм. Перед посевом во все опытные сосуды вносят стерильный раствор глюкозы из расчета: 6 % (по массе) - для анаэробного культивирования. Посевной материал в количестве 3-4 млн клеток добавляют в каждый сосуд для культивирования.

Выращивание дрожжей проводят при анаэробных условиях. Анаэробные условия (2-й вариант) обеспечиваются высоким слоем среды во флаконах и стационарными условиями культивирования. Для определения скорости брожения в одном флаконе ватную пробку заменяют стерильной резиновой пробкой с затвором, заполненным до половины H_2SO_4 . На верхний конец затвора необходимо надеть резиновый клапан. Затвор обеспечивает поглощение воды, испаряющейся из среды, и свободное выделение CO_2 , образовавшейся при брожении. Продолжительность эксперимента 96 ч. Температура культивирования - 25- 30 °С. Периодически (раз в сутки) из культуральных сосудов (из колбы и флакона без затвора) стерильно отбирают пробы для анализов, одновременно флакон с затвором взвешивают. Концентрацию дрожжей в культуральной среде определяют нефелометрически, используя кювету с длиной оптического пути 0,5 см и зеленый светофильтр № 6 ($\lambda = 540$ нм). Для перехода от показаний ФЭК к количеству клеток строят калибровочную кривую зависимости между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема. Для ее построения готовят 5—6 суспензий дрожжей разной плотности. В этом случае можно воспользоваться оставшимся инокулятом либо сделать дополнительный смыв клеток со скошенного сусло-агара. Оптическую плотность каждой суспензии измеряют на ФЭКе. Наиболее точные результаты получаются при работе с суспензиями, которые дают показания на средней шкале прибора — от 0,1 до 0,7 D. Затем в каждой суспензии подсчитывают число клеток дрожжей, пользуясь камерой Горяева. Количество клеток дрожжей в 1 мл соответствующей суспензии вычисляют по формуле:

$$M = a \cdot 1000 / h \cdot s,$$

где M — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число клеток в квадрате

сетки; h — глубина камеры (0,1 мм); s — площадь квадрата сетки (0,04 мм²); 1000 мм² = 1 мл. Тогда количество клеток дрожжей в 1 мл суспензии = $a \cdot 25 \cdot 10^4$.

1.5 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результатов.

2.6 Практическое занятие 6 (2 часа).

Тема: «Регуляция процессов брожения»

2.6.1 Задание для работы:

1. Определить концентрацию этанола

2.6.2 Краткое описание проводимого занятия

Определение скорости брожения при разных условиях культивирования и средах с разным составом. О скорости брожения g судят, во-первых, по количеству CO_2 , выделившегося в единицу времени из определенного объема. Ферменты для определения этанола выпускаются в виде специального набора «Фотоэтанол» («Импакт» Москва, Россия), который включает три реагента.

Реагент 1 — фосфатный буфер (pH 7,0), субстрат пероксидазы; перед использованием содержимое флакона растворяют в 100 мл дистиллированной воды; раствор стабилен при хранении в темном флаконе при температуре 2—6 °С в течение 48 ч.

Реагент 2 — калибровочный раствор этанола.

Реагент 3 — лиофильно-высушенный порошок, содержащий фермент алкогольоксидазу и его стабилизаторы; стабилен при 2—6 °С в течение 3 мес.

Рабочий реактив готовят добавлением к реагенту 1 содержимого флакона 3 и 1 мг пероксидазы. Рабочий реактив стабилен при 2—6 °С в темноте не дольше 48 ч.

Для анализа культуральную жидкость разбавляют водой в 20 раз, тщательно перемешивают, отбирают из них аликвоты объемом 20 мкл и вносят в пробирки, содержащие 2 мл рабочего реагента. Параллельно в одну пробирку вносят 20 мкл калибровочного 1%-го раствора этанола, предварительно разбавленного, как и исследуемые пробы. Оптическую плотность реакционной смеси измеряют через 30 мин инкубации при комнатной температуре. Измерение проводят на ФЭК при длине волны 470—540 нм относительно рабочего реактива, в который вносят 0,04 мл дистиллированной воды, в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Концентрацию этанола рассчитывают по формуле:

$$C = (E_0/E_{ст}) C_{ст} \cdot 1\%,$$

где E_0 — оптическая плотность в кювете с образцом, измеренная относительно холостой пробы; $E_{ст}$ — оптическая плотность в кювете со стандартом; $C_{ст}$ — концентрация этанола в стандартном растворе.

1.6 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результатов.

2.7 Практическое занятие 7 (2 часа).

Тема: «Регуляция клеточной дифференцировки и клеточного цикла у микроорганизмов»

2.7.1 Задание для работы:

1. Изучить морфологию и цитологию дрожжей, в зависимости от разных условий культивирования.

2.7.2 Краткое описание проводимого занятия

В работе используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Посевной материал выращивают в пробирках на скошенном сусли-агаре (2 % агара) в течение 2 сут при 30 °С. Затем биомассу смывают стерильной водой и переносят по 3—4 мл в каждый сосуд для культивирования.

Дрожжи для опыта выращивают на среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0; KH_2PO_4 — 1,0; KCl — 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,2; CaCl_2 — 0,05; дрожжевой автолизат — 50 мл; pH 6,0. Вода водопроводная. Каждый студент готовит 750 мл среды, разливает ее по 150 мл в 2 качалочные колбы (объем колбы 750 мл) и в 3 флакона (объем флакона 250 мл). Среда стерилизуют при 1 атм. Отдельно готовят необходимое количество 50%-го раствора глюкозы и стерилизуют его при 0,5 атм. Перед посевом во все опытные сосуды вносят стерильный раствор глюкозы из расчета: 6 % (по массе) - для анаэробного культивирования. Посевной материал в количестве 3-4 млн клеток добавляют в каждый сосуд для культивирования.

Выращивание дрожжей проводят при анаэробных условиях. Анаэробные условия (2-й вариант)

Изучение морфологии и цитологии дрожжей. Каждую пробу первого и второго вариантов опыта микроскопируют, определяя размеры дрожжевых клеток и наличие в них гликогена, а также подсчитывают процент живых и почкующихся клеток.

Размеры дрожжевых клеток определяют в препарате «раздавленная капля» с объективом 40х, используя винтовой окулярный микрометр. Измеряют не менее 30 клеток и средние величины записывают в табл.

Гликоген может накапливаться в цитоплазме дрожжей в виде гранул. При обработке клеток раствором Люголя он приобретает красно-коричневый цвет. Для наблюдения за содержанием гликогена в клетках готовят препарат «раздавленная капля» в растворе Люголя и просматривают его с объективом 40 х.

Размеры клеток дрожжей (длина и ширина, мкм) при росте в аэробных и анаэробных условиях

Время, ч	Аэробные		Анаэробные	
	длина	ширина	длина	ширина
0				
7				
24				
48				
и т.д.				

В каждом препарате следует просчитать не менее 100 клеток (в нескольких полях зрения). Результаты записывают в табл. 22.9.

Количество дрожжевых клеток, имеющих почки, подсчитывают в препарате «раздавленная капля» с объективом 40*. Результаты записывают в табл.

Количество живых и мертвых клеток дрожжей подсчитывают в препаратах, обработанных раствором метиленового синего. Для этого в пробирке смешивают равные объемы метиленового синего (10 мг/100 мл) и суспензии дрожжей и встряхивают в течение 10—15 мин. Мертвые клетки легко адсорбируют краску и окрашиваются в синий цвет. Живые клетки, восстанавливая метиленовый синий, остаются бесцветными. Подсчет ведут в препарате «раздавленная капля» с объективом 40 х. На основании полученных данных составляют отчет.

ных условиях и их цитологических особенностей, сводную таблицу результатов

1.7 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результатов.

2.8 Практическое занятие 8 (2 часа).

Тема: «Регуляция клеточной подвижности у микроорганизмов»

2.8.1 Задание для работы:

1. Изучить подвижность бактерий в зависимости от разных условий культивирования.

2.8.2 Краткое описание проводимого занятия

В зависимости от расположения и количества жгутиков микробы подразделяют:

- а) *монотрихи* - микроорганизмы имеющие на одном из полюсов один жгутик, движения активные, поступательные (псевдомонас);
- б) *лофотрихи* - микробы имеющие на одном из полюсов пучок жгутиков (листерии);
- в) *амфитрихи* - микробы, имеющие жгутики на обоих полюсах микробной клетки;
- г) *перитрихи* - микробы, у которых жгутики расположены по всей поверхности клетки (*E.coli*).

Есть виды микроорганизмов, обладающие подвижностью, но жгутиков не имеют (спирохеты, лептоспиры). Их движение обусловлено импульсивными сокращениями двигательного фибриллярного аппарата микробной клетки.

Для определения подвижности у бактерий необходимо использовать культуру не старше суточного возраста, так как старые культуры утрачивают способность передвигаться.

Небольшое количество исследуемой культуры переносят петлей в каплю водопроводной воды на чистом покровном стекле, которое затем кладут каплей вниз на предметное стекло с шлифованной лункой или на стеклянное кольцо, приклеенное к предметному стеклу. Этот способ носит название «наблюдение в висячей капле»/

Определить подвижность провести у *E.coli*, выращенной при разных температурных режимах.

	t-22°C	t-27 °C	t-32°C	t-37 °C	t-42 °C
Подвижность <i>E.coli</i>					

1.8 Результаты и выводы

Привести расчеты и провести анализ полученных результатов

2.9 Практическое занятие 9 (2 часа).

Тема: «Регуляция хемотаксиса. Цитоплазматические сигнальные белки»

2.9.1 Задание для работы:

1. Выявить влияние ряда сахаров на таксис *Escherichia coli*.

2.9.2 Краткое описание проводимого занятия

Подвижные бактерии активно перемещаются в направлении, определяемом теми или иными внешними факторами. Такие направленные перемещения бактерий называют таксисами. В зависимости от фактора различают хемотаксис (частный случай - аэротаксис), фототаксис, магнитотаксис, термотаксис и вискозитаксис.

Наибольшее внимание привлекает изучение хемотаксиса, т.е. движения в определенном направлении относительно источника химического вещества. Для каждого организма все химические вещества в этом плане могут быть разделены на две группы: инертные и вызывающие таксисы (эффекторы). Среди последних выделяют аттрактанты (вещества, привлекающие бактерий) и репелленты (вещества, отпугивающие бактерий). Аттрактантами могут быть сахара, аминокислоты, витамины, нуклеотиды и другие химические молекулы; репеллентами - некоторые аминокислоты, спирты, фенолы, неорганические ионы. Аттрактантом для аэробных прокариот и репеллентом для анаэробных прокариот является молекулярный кислород. Аттрактанты часто представлены пищевыми субстратами, хотя не все вещества, необходимые для организма, выступают в качестве аттрактантов. Также не все ядовитые вещества служат репеллентами и не все репелленты вредны. За чувствительность бактерий к градиентам определенных факторов ответственны специфические рецепторы. Изучение хемотаксиса у *Escherichia coli* позволило обнаружить свыше 30 различных хеморецепторов, представляющих собой белки, синтезируемые независимо от присутствия индуктора или только в результате индукции. Рецептор реагирует на эффектор и передает сигнал по определенному пути, конкретный механизм которого неизвестен, на "мотор" жгутика. У бактерий с перитрихальным жгутикованием выявлены два вида двигательного поведения: прямолинейное движение и кувыркание, т.е. периодические и случайные изменения направления движения. Если бактерия перемещается в сторону оптимальной концентрации аттрактанта, ее прямолинейное движение, ориентированное по отношению к химическому веществ, становится более длительным, а частота кувырканий более низкой, что позволяет ей в конечном итоге перемещаться в нужном направлении.

Цитоплазматические сигнальные белки и регуляторный механизм хемотаксиса. Взаимодействие между рецепторами и переключателем жгутика осуществляется четырьмя белками:

- CheA — гистидинкиназа
- CheY — PO, аспартаткиназа
- CheW — «адаптор» между рецептором и CheA
- CheZ — белок, способствующий дефосфорилированию CheY-P

Пара белков CheA-CheY представляет собой двухкомпонентную регуляторную систему. Наиболее существенным отличием от классических систем является то, что CheY не является транскрипционным фактором и, соответственно, у него отсутствует ДНК-связывающий домен. Гистидинкиназа CheA функционирует в виде димера, с которым связываются два мономера CheW, и уже этот комплекс вступает в ассоциацию с димерным рецептором. В составе такого комплекса автокиназная активность CheA резко возрастает, что усиливает перенос фосфата от CheA~P к CheY. CheY~P связывается с FlhM моторно-переключательного комплекса базального тела, что приводит к вращению жгутика по часовой стрелке. CheZ предотвращает накопление CheY~P, стимулируя автофосфатазную активность CheY. При отсутствии аттрактанта концентрация CheY~P поддерживается на уровне, способствующем вращению жгутика преимущественно по часовой стрелке и, следовательно, отсутствию упорядоченного движения бактерии. Связывание аттрактанта с рецептором индуцирует конформационное изменение, которое передается через мембрану и подавляет автокиназную активность CheA. Концентрация CheY~P падает, и жгутики бактерии более продолжительное время вращаются против часовой стрелки. Поэтому клетки будут дольше двигаться прямолинейно, если они попадают в среду с более высокой концентрацией аттрактанта. Однако этот механизм не объясняет, как клетка может реагировать на постоянно возрастающую концентрацию аттрактанта. Этой цели служит сенсорная адаптация.

Определить влияние аттрактантов (глюкозы, лактозы, мальтозы, маннита, дульцита) и репеллентов (этилового спирта, на хемотаксис путём добавления их к культуре *Escherichia coli*.

1.9 Результаты и выводы

провести анализ полученных результатов и сделать выводы.