

## Сложность генных сетей прокариот и эукариот.

### Введение.

Рост сложности организмов всегда считался глобальным трендом эволюции жизни на Земле и признаком эволюционного прогресса. Данные палеонтологии указывают на рост сложности организмов и биосферы с момента появления жизни на Земле. Этот рост идет неравномерно, замедляясь и ускоряясь, но его не остановили ни массовые вымирания, ни глобальные катастрофы. Так как фенотипические характеристики организмов кодируются в их геномах, ожидалось, что у организмов различной сложности будут обнаружены соответствующие различия в количестве генов и в размерах геномов. Однако результаты геномных проектов были совершенно неожиданными. Оказалось, что *лишь у прокариот сложность организации в целом коррелирует с размерами геномов и числом генов. Закономерный рост размера геномов и числа генов четко прослеживается лишь при переходе от прокариот к эукариотам и менее четко – при переходе от одноклеточных эукариот к многоклеточным эукариотам.* И самое неожиданное – и у одноклеточных, и у многоклеточных эукариот *отсутствует связь между биологической сложностью, размерами геномов и числом генов* (слайд 2,3). Последнее явление получило название *геномный парадокс* и заставило ряд биологов серьезно усомниться в самом существовании прогрессивной эволюции. Рост размеров генома объясняли насыщением генома “эгоистичной ДНК” в виде различных мобильных генетических элементов, либо накоплением “генетического мусора” в виде нефункциональной ДНК (амплифицированные повторы, псевдогены и т.д.) и не связывали с приспособленностью организма, его филогенезом и уровнем его организации (биологической сложностью организма). В данной лекции мы поговорим о том, как соотносятся (и соотносятся ли вообще) биологический прогресс и биологическая сложность, причем, так как в основе любого фенотипического признака лежит генная сеть, особое внимание уделим сложности генных сетей.

**Существует ли биологический прогресс?** Понятие “*биологический прогресс*” восходит к лестнице существ Аристотеля и со времен Аристотеля критикуется за антропоморфизм, антропоцентризм и субъективность критериев. Дарвиновская парадигма в биологии еще более усложнила вопрос: вместо одного общего биологического прогресса появилось множество его разновидностей. С одной стороны выделились *морфофизиологический прогресс*, под которым понималось увеличение сложности биологической организации под действием отбора (о сложности биологической организации речь пойдет ниже) и собственно *биологический прогресс*, связанный с репродуктивным успехом того или иного генотипа безотносительно к его биологической сложности. С другой стороны были выделены *идеоадаптация* (и ее крайний случай – *специализация*) - приобретение в ходе эволюции приспособлений, увеличивающих шансы на выживание и/или репродуктивный успех в определенной экологической нише и *ароморфоз* - приобретение адаптаций широкого профиля, увеличивающих шансы на выживание и/или репродуктивный успех во множестве экологических ниш. Кроме этих, наиболее известных, подразделений есть и другие, например инадаптивность и эвадаптивность. Под *инадаптивностью* понимается некоррелированное (негармоничное) развитие признаков под действием отбора. Наоборот, *эвадаптивность* подразумевает гармоничное развитие признаков. Например, сочетание закрытого таза и прямохождения у человека сильно затрудняет роды (инадаптивное сочетание признаков), тогда как прямохождение и открытый таз птиц полностью снимает все проблемы (эвадаптивное сочетание признаков). Обилие таких частных определений и, главное, - их некорректное употребление, привели к тому, что в ряде современных сводок по эволюции вообще отказывали биологическому прогрессу в праве на существование – постулировалось, например, что все одновременно живущие виды одинаково приспособлены к окружающей среде, или прогрессивным считался таксон, возникший в эволюции позже.

Между тем, по меткому выражению Красилова, даже газетное сообщение типа “после пронесшегося тайфуна пляж покрыт толстым слоем гниющих водорослей, погибли тысячи выброшенных на берег рыб и сотни птиц, несколько человек получили ранения — им оказана медицинская помощь” наглядно демонстрирует реальность биологического прогресса, суть которого предельно обще можно сформулировать как *уменьшение вероятности гибели организма (именно каждого организма!) от неопределенных, непредвиденных причин* (Красилов). Прогресс в этом смысле в природе, как правило, достигается через *автономизацию процессов репродукции, жизнедеятельности и передачи информации у организмов от повреждающего влияния внешней среды* (Шмальгаузен), или через *усиление у организмов способности управлять средой* (Дж. Хаксли). Определение Дж. Хаксли на первый взгляд выглядит антропоморфным, но стоит вспомнить, как растения привлекают насекомых-опылителей, или тот факт, что, паразиты, меняя метаболизм, могут менять и поведение своих хозяев (классический пример — обычная лихорадка), как обвинение в антропоморфизме окажется необоснованным.

**Существует ли биологическая сложность?** История термина “*биологическая сложность*” (*сложность биологической организации*) напоминает историю с “биологическим прогрессом”. До тех пор, пока инструментом биолога были световой микроскоп и скальпель, виды достаточно просто делились на более или менее сложные. Но по мере того, как инструментарий усложнялся, становилось все труднее понять, кто сложнее — амеба или слон, посему появилось множество частных определений (морфофизиологическая, поведенческая, биохимическая и т.п. сложности). Все эти частные сложности успешно математически формализовались, но формализовать биологическую сложность в общем не удастся по сей день, как из-за разной степени изученности ее частных проявлений, так и из-за системного характера жизни — ее принципиальной несводимости к сумме свойств составляющих ее элементов. Одной из попыток взглянуть на жизнь, как на системный феномен, является концепция *генных сетей*. Для темы данной лекции здесь важно подчеркнуть, что генная сеть — это группа координированно экспрессирующихся генов, *выполняющих общую функцию*. То есть, генная сеть — это функциональное объединение генов. Структурное объединение генов, если оно есть, всегда будет лишь следствием их участия в общей функции. Но при этом структурное объединение генов может серьезно влиять на степень и саму возможность функционального объединения.

Рассматривая функционирование генных сетей и топологию их графов, можно выделить инвариантные характеристики биосистем, связанные с их сложностью. Это — (1) *увеличение числа элементов биосистемы*, (2) *увеличение числа связей между элементами*; (3) *рост числа уровней иерархии*; (4) *рост числа элементов и связей биосистемы, работающих в единицу времени и/или в единице пространства*; и (5) *рост разнообразия режимов динамического поведения биосистем* (слайд 4).

Подведем промежуточный итог: итак, биологический прогресс и биологическая сложность реально существуют. Таксоны, эволюционно “выбравшие путь” биологического прогресса, должны минимизировать вероятность гибели каждого организма от неопределенных, непредвиденных причин за счет автономизации процессов жизнедеятельности от среды и/или управления средой. Теперь попробуем выяснить, какую роль в этом эволюционном “выборе” играет биологическая сложность, в частности сложность генных сетей? Для этого сравним общую организацию генных сетей прокариот (на примере эубактерий) и эукариот, и основные направления их эволюции.

### **Организация генных сетей про- и эукариот: принципы общие, реализация различна.**

Вспомним, что любая генная сеть состоит из (1) ядра сети — собственно группы последовательностей ДНК (РНК), ответственных за формирование признака, (2) путей передачи сигналов от рецепторов к регуляторным районам элементов ядра сети, (3) центральных регуляторов, регулирующих сразу несколько элементов ядра сети и (4)

набора положительных или отрицательных обратных связей, обеспечивающих функционирование сети в определенном режиме, или наоборот, запрограммированное отклонение поведения сети от этого режима (слайд 5). Рассмотрим, в каком виде реализуются эти составные части у прокариот и эукариот.

Ядро сети эубактерий представлено *оперонами* (на слайде 6 представлен триптофановый оперон *Escherichia coli*). Оперон - группа генов с общими регуляторными районами, транскрибирующаяся как один цистрон. Преимуществом оперона является быстрота и четкость регуляции экспрессии – белковые продукты сразу синтезируются в стехиометрических количествах, гены, входящие в оперон, одновременно отвечают на регуляторные воздействия, при этом стехиометрия не нарушается. Основой такого функционального единства является структурное сцепление генов. Другое преимущество оперона, вытекающая из его структуры – экономия на размере ДНК и на числе молекул-регуляторов (регуляторный район один для всех генов оперона). Но структура оперона таит и недостатки - затруднения в тонкой регуляции каждого гена (1) и чувствительность к повреждениям - мутация в общем регуляторном районе или мутация ниже старта транскрипции выводят из строя весь оперон или нарушают стехиометрию (2) (цис-мутации).

Ядро сети эукариот представлено индивидуально регулируемыми генами, организованными в функциональные группы – *касеты генов*. Каждый ген в кассете имеет свои собственные регуляторные районы, в которых есть одинаковые сайты связывания, что и обеспечивает активацию всех генов кассеты при появлении определенного транскрипционного фактора – центрального регулятора (слайд 6). Каждый ген кассеты транскрибируется как отдельный цистрон, то есть гены в кассете структурно не сцеплены. Преимущества такой организации – это тонкая регуляция каждого гена, помехоустойчивость (мутация в одном гене, если это не ген центрального регулятора, не отражается на других генах кассеты) и то, что любой ген может участвовать в разные моменты времени в разных кассетах. Недостатки - отсутствие стехиометрии (всегда требуется дополнительная подгонка), сложность регуляции и неэкономичность – генные кассеты сами по себе занимают много места в геноме, требуя, кроме того, много молекул и сложной регуляции генов центральных регуляторов. Ведь, в отличие от оперона, для запуска кассеты нужно, чтобы как минимум одна молекула центрального регулятора связалась с каждым геном кассеты.

Теперь, в общем, рассмотрим, что представляют собой центральные регуляторы про- и эукариот. По способу функционирования центральные регуляторы можно разбить на две большие группы – сигма-факторы ( $\sigma$ -факторы) и транскрипционные факторы<sup>1</sup>.

*Сигма-факторы* являются субъединицами белкового комплекса РНК-полимеразы, обеспечивающими специфичное связывание этого комплекса с сайтом связывания. С началом транскрипции сигма-факторы диссоциируют из комплекса (слайд 8). Преимуществами сигма-факторов являются быстрота регуляции и ее экономичность - быстрое рециклирование сигма-факторов (слайд 9) позволяет обойтись небольшим числом молекул. Недостатки регуляции сигма-факторами связаны с тем, что прежде, чем связаться с сайтом ДНК, сигма-фактор должен войти в комплекс РНК-полимеразы. Размеры этого комплекса накладывают ограничения на размер белка сигма-фактора, а, следовательно, и на размер сайта связывания ДНК, а также на возможность эволюции сигма-факторов (чем меньше белок, тем меньше в нем функционально малозначимых структур, за счет которых в основном и происходит эволюция, не говоря уже о том, что для малых белков закрыт путь эволюции путем димеризации структур). Другим ограничением является невозможность взаимодействия множества сигма-факторов в

---

<sup>1</sup> Подчеркиваю, что здесь приводится только функциональная классификация (“по способу действия”). Генетическая естественная классификация (“кто от кого произошел”) регуляторных молекул пока не создана. Исторически сложилось так, что для эукариот применяется только термин “транскрипционный фактор” несмотря на то, что у них описаны регуляторные молекулы, действующие аналогично сигма-факторам прокариот.

одном комплексе “за отсутствием посадочных мест”. Каждый следующий сигма-фактор должен ждать, пока его предшественник не “освободит” место в РНК-полимеразном комплексе, причем ждать не тут же рядом, на сайте ДНК, как это делает транскрипционный фактор, а в цитоплазме нуклеоида, или, в лучшем случае в примембранном пространстве (см. ниже). Впрочем, пока речь идет о небольших объемах бактериальной клетки – это не проблема, проблемой это становится, когда размеры клетки увеличиваются до эукариотических<sup>2</sup>. Наконец, быстрое рециклирование накладывает временные ограничения на связь с ДНК.

Несмотря на эти ограничения у бактерий описаны сложные генные сети с участием сигма-факторов. Например, на слайде 10 изображена упрощенная генная сеть споруляции *Bacillus subtilis*. Слева изображена материнская клетка, справа – проспора. Правее последовательно сверху вниз даны фотографии некоторых стадий споруляции. Проспора и материнская клетка разделены полярной септой. Объем проспоры намного меньше объема материнской клетки, так как полярная септа смещена к одному из полюсов клетки (отсюда и название). Формирование полярной септы предопределено повышенной концентрацией ассоциированных с мембраной белков, среди которых есть SpoA-P, возле обоих полюсов клетки. Неясно, что определяет, возле какого конкретно полюса начнет формироваться полярная септа, возможно выбор определяется стохастикой концентраций мембранассоциированных белков.

До споруляции в цитоплазме клетки присутствует небольшое количество молекул сигма А и сигма Н – факторов, причем молекул сигма А больше, чем сигма Н. Голод, кворум-чувствительные сигналы<sup>3</sup>, сигналы клеточного цикла, через несколько генетических триггеров (на схеме не показаны) активируют белок SpoA-P, запускающий формирование полярной септы и активирующий экспрессию сигма А и сигма Н – факторов, которые в свою очередь, активируют экспрессию сигма Е и сигма F – факторов соответственно. Сигма F связывается в цитоплазме анти-фактором SpoIIAB и, таким образом, теряет активность. Высвободить сигма F из комплекса с SpoIIAB может белок SpoIIAA. Белок SpoIIЕ, ассоциированный с формирующейся полярной септой, переводит фосфорилированный SpoIIAA-P в SpoIIAA, вследствие чего в примембранном пространстве растет концентрация SpoIIAA и соответственно активного сигма F. SpoIIЕ локализован на обеих частях полярной септы, но, по-видимому, из-за того, что материнская клетка намного больше проспоры высвобождение сигма F преимущественно идет в проспоре.

Сигма Е синтезируется в виде профактора, который переводится в фактор ассоциированной с септой протеазой SpoIIГА. SpoIIГА материнской клетки активируется септальным белком SpoIIR проспоры, синтез которого активируется сигма F проспоры (пример межклеточного взаимодействия при дифференцировке у прокариот).

Параллельно с этими процессами в дело вступает ген SpoIIIЕ. Его продукт неизученным пока образом участвует в перераспределении копий поделившейся к тому времени бактериальной хромосомы между проспорой и материнской клеткой. Причем, по

---

<sup>2</sup> В настоящее время описана зубактерия *Epulopiscium fishelsoni* размером 80\*600 микрометров, что сравнимо с размерами эукариот. Как она решает проблему адресной внутриклеточной коммуникации вообще и проблему регуляции сигма-факторами в частности – неясно. Можно лишь предполагать, что в этом ей помогает крайне вытянутая форма. То есть, несмотря на большие размеры, мембрана везде находится близко от нуклеоида и прослойка цитоплазмы между ними (а, следовательно, и область свободной диффузии) невелика. Ассоциация регуляторных молекул с той или иной областью мембраны, граничащей с конкретной областью нуклеоида, в какой-то мере заменяет посадку на сайт ДНК или направленный внутриклеточный транспорт у эукариот. О том, насколько сложны могут быть сетевые взаимодействия с участием таких локально высоких примембранных концентраций молекул, свидетельствует генная сеть споруляции у *Bacillus subtilis* (см. текст и слайд10). С другой стороны, все гигантские виды *Epulopiscium* являются эндосимбионтами или эндопаразитами рыб-хирургов. Эндосимбионту или эндопаразиту легче развить гигантизм, чем свободноживущей форме (вспомним ленточных червей), поскольку они находятся в более стабильных условиях и часть своего метаболизма, а, следовательно, и проблемы с ним связанные, “перекладывают на плечи” хозяев.

<sup>3</sup> См. ниже

мере перераспределения экспрессия генов не прекращается, а первыми в протспору проникают ориджин-проксимальные гены. Они ингибируют там сигма E и всего комплекса белков, создающих его локально-высокую примембранную концентрацию. В материнской клетке остается двойная порция ориджин-дистальных генов (от “родной” копии хромосомы материнской клетки и от ориджин-дистальной части копии хромосомы, перемещаемой в протспору). Благодаря этому аналогу дозовой компенсации, синтез сигма F в материнской клетке блокируется, а в протспоре, где ориджин-дистальных генов пока нет вообще, успешно продолжается. В итоге, пул сигма факторов в материнской клетке и протспоре начинает различаться. В цитоплазме материнской клетки присутствуют сигма факторы A, H и E, в цитоплазме протспоры - A, H и F.

Далее сигма F в протспоре активирует синтез сигма G, который запускает комплекс реакций, завершающих формирование протспоры. К тому времени копия бактериальной хромосомы уже перенесена в протспору полностью, поэтому синтез сигма F ингибируется. Сигма G комплексуется с антифактором SpoIIAB. Механизм высвобождения сигма G из комплекса с антифактором SpoIIAB в общих чертах аналогичен таковому для сигма F с той разницей, что с материнской стороны его, через септальные белки, неизученным пока образом активирует сигма E. Кроме этого, материнской клетке сигма E активирует синтез белков SpoIIIID и сигма K. Сигма K синтезируется в виде профактора, превращение которого в фактор опять таки, через септальные белки активирует протспориальный сигма G. Сигма K ингибирует сигма A и сигма E, активирует сам себя и ряд генов (в том числе SpoIIIID), заканчивающих процесс споруляции с материнской стороны. Эти процессы очень сложны, требуют тонкой регуляции множества генов, поэтому кроме сигма-факторов в них участвуют транскрипционные факторы (см. ниже) и такие экзотические способы тонкой регуляции, как необратимое выщепление части регуляторного района оперона. В частности, один из таких транскрипционных факторов – gerE ингибирует синтез сигма K.

Несмотря на столь сложный механизм и сложные морфологические перестройки (по сути дела спорангий *Bacillus subtilis* функционирует как многоклеточный организм), нужно отметить, что на всех стадиях, за исключением последней, в клетках одновременно присутствуют не более трех ответственных за дифференцировку сигма-факторов (причем один из них уже ингибируется и его количество незначительно) – разительный контраст с эукариотами, у которых даже простое поддержание специфической функции дифференцированной клетки требует одновременного взаимодействия около десятка транскрипционных факторов<sup>4</sup>, а процессы дифференцировки требуют взаимодействий уже нескольких десятков специфических транскрипционных факторов (см. лекцию К.В. Гунбина).

Центральными регуляторами прокариот являются *транскрипционные факторы* - белковые молекулы, связывающиеся с сайтами ДНК и взаимодействующие с комплексом РНК-полимеразы. Взаимодействие с сайтами ДНК и с комплексом РНК-полимеразы, как правило, происходят независимо друг от друга (слайд 11). Эволюционные взаимоотношения между сигма-факторами и транскрипционными факторами исследованы в настоящее время недостаточно. Известный эволюционист Кавалье-Смит предполагает, что прогеноты (общие предки эукариот эубактерий и археобактерий) имели и транскрипционные факторы, и сигма-факторы (или подобные им по механизму регуляторные молекулы). По мере того, как эукариоты развили нуклеосомную компактизацию ДНК, у них возникли проблемы с транскрипцией. Транскрипция требовала декомпактизации ДНК, но нуклеосома расплеталась так долго, что комплекс РНК-полимеразы с сигма-факторами успевал диссоциировать (см. слайд 9). В итоге эукариоты приобрели SRB белки<sup>5</sup>, чьей функцией является расплетение нуклеосом, и развили регуляцию транскрипционными факторами, образующими более стабильный,

<sup>4</sup> Например, нормальная регуляция синтеза тиреоидных гормонов требует минимального набора 6 взаимодействующих транскрипционных факторов.

<sup>5</sup> suppressor of RNA polymerase B

нежели сигма-факторы, комплекс с ДНК. В ходе дальнейшей эволюции у части транскрипционных факторов выработалась способность образовывать комплекс с ДНК-сайтами независимо от сборки комплекса РНК-полимеразы. Реликтами предполагаемой предковой регуляции сигма-факторами (или подобными им молекулами) у современных эукариот являются так называемые базовые транскрипционные факторы TFIIВ, TFIIЕ и TFIIF, которые инициируют сборку на промоторах полимеразного комплекса с РНК-полимеразой II (РНК-полимеразой В), ответственной за транскрипцию белоккодирующих генов эукариот. Последовательность сборки этого комплекса представлена на слайде 12. Обратите внимание, что TFIIF связывается с РНК-полимеразой II до того, как она свяжется с ДНК – черта, характерная для сигма-факторов бактерий. Кроме того, аминокислотные последовательности отдельных субъединиц факторов TFIIВ, TFIIЕ и TFIIF обнаруживают явную гомологию с последовательностями сигма 70 фактора *E.coli*.

Преимуществами регуляции транскрипционными факторами являются тонкая регуляция транскрипции (1), чему способствует возможность образования транскрипционными факторами сложных мультимерных комплексов на нескольких сайтах (со всеми их преимуществами - кооперативным связыванием, синэргизмом и т.д.) (2), время существования комплекса “транскрипционный фактор - ДНК” может не зависеть от времени существования комплекса РНК-полимеразы, что позволяет множеству факторов связываться с протяженными регуляторными районами, “заранее подготавливая” регулировку генов (3), ограничения на размер белка транскрипционного фактора менее жесткие (4), что открывает широкие возможности для их эволюции. К недостаткам можно отнести медленное рециклирование транскрипционных факторов.

Сравнивая организацию генных сетей про- и эукариот нетрудно заметить, что они организованы по общим принципам: ядро сети представляют функциональные объединения генов, регулируемых одними и теми же молекулами. Но вот реализация этих принципов совершенно различна: прокариоты действуют крайне экономно - функциональное объединение их генов в значительной мере обеспечивается их структурным объединением. Роль структурного объединения у эукариот незначительна. У прокариот несколькими генами действительно может управлять *одна и та же* молекула (как за счет оперонов, так и из-за быстрого рециклирования). Когда мы говорим, что кассету генов эукариот активирует один транскрипционный фактор, мы всегда помним, что речь идет о *нескольких* молекулах этого фактора. Можно сказать, что перед нами две стратегии развития генных сетей – экономичность и, как следствие – простота регуляции у прокариот и избыточная сложность у эукариот. В чем причина таких разных эволюционных стратегий?

Нужно заметить, что сама по себе оперонная структура не исключает тонкой регуляции генов. Гены эукариот регулируются не только из района оперонного регулятора, но и из других регуляторных районов. На слайде 6 изображен аттенюатор, осуществляющий тонкую регуляцию *trp*-оперона в зависимости от избытка триптофана. Аттенюаторы позволяют подстраивать регуляцию генов в зависимости от наличия в клетке разных нуклеозидтрифосфатов, количества свободных рибосом и т.д.. В *str*-опероне аттенюатор участвует в механизме, переключающем регуляцию оперона с одного промотора на другой. В геномах бактерий обнаружены регуляторные районы, удаленные от старта транскрипции, энхансеры и сайленсеры. Пусть в небольшом количестве, но имеются опероны, корегулируемые несколькими транскрипционными факторами прямым и непрямым способом (см. ниже слайды 29 и 30). Наконец, в оперонах могут быть “молчащие” гены, продукты которых в норме нефункциональны, но в особых условиях, вследствие изменения регуляции, начинают экспрессироваться (на слайдах 10 и 32 отмечена регуляция выщеплением). Тем не менее, регуляторные районы прокариот, как правило, уступают по длине и числу сайтов регуляторным районам эукариот (слайд 13).

Рассмотрим регуляторный район, содержащий J сайтов связывания транскрипционных факторов. Предполагая, что каждый сайт может находиться в двух состояниях: (1) свободном и (2) связанном с соответствующим транскрипционным

фактором, можно оценить  $W$  - полное количество состояний регуляторного района - как  $2J$ . При  $J=20$ ,  $W \sim 1000$ . Иными словами, даже в простейшем варианте с двумя состояниями каждого сайта емкость такого кода регуляции транскрипции весьма велика. Значит, даже при небольшом числе транскрипционных факторов, но с множеством сайтов связывания в регуляторном районе гена, его кодирующая емкость будет огромна (слайд 14). Таким образом, короткие регуляторные районы прокариот определяют низкую сложность регуляции их генных сетей. Но, сама по себе оперонная структура неспособна ограничить длину регуляторных районов и их насыщенность сайтами. Следовательно, должны быть какие-то другие, более общие причины, связывающие размер и сложность генома прокариот.

### **Организация клетки, организация генома и ограничения на сложность генных сетей.**

Вспомним общие черты организации прокариотической клетки (слайд 15). Прокариотам свойственны малые размеры клеток<sup>6</sup>, гаплоидность<sup>7</sup>, кольцевая<sup>8</sup> униреликционная<sup>9</sup> хромосома, пассивный механизм сегрегации хромосом, ассоциированный с мембраной, отсутствие мембранных компартментов и, как следствие, невозможность разделения метаболических процессов в пространстве, совмещение транскрипции и трансляции во времени и пространстве<sup>10</sup>, отсутствие активного внутриклеточного транспорта, роль которого играет диффузия и отсутствие универсальных клеточных моторов, благодаря которым такой транспорт мог бы осуществляться<sup>11</sup>, муреиновый экзоскелет – клеточная стенка. Отсутствие универсальных моторов и клеточная стенка определяют тип питания бактерий – пиноцитоз.

**Катастрофа мутационных ошибок.** Любая популяция генетических самовоспроизводящихся систем имеет верхнюю границу темпов мутирования. Гаплоидные популяции достигают ее, когда за один цикл репликации возникает одна летальная мутация на геном (катастрофа мутационных ошибок Эйгена<sup>12</sup>). Отсюда, чем выше средняя вероятность мутирования ( $1-q$ ), тем ниже предел размера генома. Значит, усложнение генетических самовоспроизводящихся систем невозможно без роста надежности хранения и копирования генетической информации. В ходе эволюции бактерии вплотную подошли к этой границе мутационной катастрофы ошибок, что запретило рост их гаплоидных геномов. Преодоление этого запрета стало главной эволюционной мотивацией усложнения организмов (слайд 16). Надежность копирования напрямую связана со скоростью репликации – чем меньше скорость репликации, тем больше времени у репарирующих систем на удаление предмутационного повреждения.

<sup>6</sup> См. сноску 2.

<sup>7</sup> Если быть точным, то гаплоидность свойственна прокариотам на большей части их жизненного цикла. Но на некоторых коротких фазах жизненного цикла разные виды бактерий могут быть в той или иной мере диплоидны. На слайде 10 изображено одно такое исключение – при созревании спорангия *B. subtilis* часть генов материнской клетки представлена двумя копиями.

<sup>8</sup> Небольшое число видов бактерий имеют линейную хромосому (*Borellia burgdorferi*, *Streptomyces lividans*).

<sup>9</sup> *Rhodobacter sphaeroides* имеет две кольцевые хромосомы и, следовательно, его геном представлен двумя репликационными.

<sup>10</sup> У бактерий родов *Planctomyces* и *Gemmata* нуклеоид отграничен от цитоплазмы двумя мембранами, у *Isosphaera* – одной. Тем не менее, транскрипция и трансляция и в этом случае совмещены во времени и пространстве.

<sup>11</sup> Роль таких моторов у эукариот выполняют акто-миозиновый и тубулин-динеиновый комплексы. Ряд паразитических бактерий имеет актиноподобные филаменты, сконцентрированные на одном из полюсов бактерий. Сокращая филаменты, бактерия пробуравливает покровы хозяина. В отличие от эукариот, актин здесь выполняет узкоспециализированную функцию и, как и другой бактериальный мотор – механизм вращения жгутика – не может считаться универсальным мотором.

<sup>12</sup> - Эйген показал, что средняя вероятность мутирования на позицию ( $1-q$ ), длина оптимальной матрицы ( $V_m$ ) и параметры ее отбора  $\sigma_m$  связаны неравенством  $V_m < V_{max} = (\ln \sigma_m) / (1-q)$ . Оптимальной считается матрица (геном), имеющая наибольший параметр отбора  $\sigma_m$ , поэтому допустимые длины последовательностей ограничены сверху величиной  $V_{max}$ . Нарушение же этого неравенства является катастрофой мутационных ошибок.

Радикальным способом повышения надежности хранения информации является диплоидность. Но, диплоидность требует роста размеров генома и, следовательно, увеличения времени на репликацию<sup>13</sup>. Но бактерии не могут позволить себе увеличить время репликации – основной стратегией эволюции бактерий стала интенсификация размножения и быстрое освоение доступного пищевого ресурса. Возможно, это связано с морфологией бактериальной клетки – малые размеры не дают возможности сделать запас, а если бы и давали – все равно пиноцитоз и слабая компартментализация требуют, чтобы все процессы расщепления ресурса шли снаружи<sup>14</sup>. Причем интенсификация пиноцитоза требует максимально увеличить отношение поверхности клетки к объему, что способствует миниатюризации клеток. Но очень мелкий организм неспособен выделиться из окружающей его водной массы: пассивно паря в толще воды (и оставаясь неподвижным относительно нее), он, по меткому замечанию Виленкина “быстро создает вокруг себя пустыню” – выедаст из непосредственно окружающего его водного слоя все биогены, одновременно насыщая воду диффундирующей наружу органикой, которую не в силах удерживать внутри клетки из-за того же самого высокого соотношения поверхность/объем. То, что при этом безвозвратно теряется более трети клеточной продукции – полбеда; хуже, что на окисление этой органики расходуется кислород, и водный слой, окружающий организм, эвтрофицируется. В этих условиях метаболизм и скорость размножения должны быть сколь возможно высокими – “если ты сам не создашь пустыню вокруг себя – ее создадут другие”. Конечно, бактерии по краям колонии имеют шанс убежать. Положение тех, кто в центре колонии значительно хуже – им остается, приглушив метаболизм и максимально расплодившись, ждать, пока волны и течения перенесут их на новое “кормовое угодье”. Наконец, если потомки соединены с предками внеклеточным матриксом - масса колонии возрастает и она, вследствие инерции, выпадает из окружающего ее (и “опустыненного”) водного слоя<sup>15</sup>.

Поэтому бактерии пошли по пути минимизации некодирующей<sup>16</sup> ДНК. Попытки обнаружить какие-либо закономерности в эволюции бактериальной ДНК, не кодирующей ни белков, ни РНК дали лишь один результат – количество такой ДНК минимизируется в процессе эволюции (слайд 17). Эта тенденция равно характеризует как межоперонную, так и внутриоперонную некодирующую ДНК. Исключениями являются облигатно паразитические бактерии, геномы которых характеризуются значительными потерями генов. Псевдогены, найденные в геномах *Mycobacterium leprae* и *Rickettsia prowazekii*, по-видимому представляют первую стадию такой утраты. Одним из способов такой минимизации является сборка генов в опероны.

**Делеции вследствие рекомбинации по повторам.** Другой причиной минимизации некодирующей ДНК служит чувствительность гаплоидных организмов к делециям. Рекомбинация по повторам чаще приводит к делециям, нежели к дупликациям, посему прокариоты “заинтересованы” в минимизации повторов в ДНК. С другой стороны, неразвитая компактизация ДНК в нуклеоиде делает длину однокитевой ДНК в репликативной вилке прокариот (1000 – 2000 п.н.) в 10 раз больше, чем у эукариот (100 –

<sup>13</sup> Подсчитано, что геном среднего эукариотического размера полностью реплицировался бы при помощи бактериального механизма транскрипции за 3 недели.

<sup>14</sup> Аналогичная тенденция наблюдается и у ряда паразитических эукариот – они утрачивают интроны, ускоряя тем самым скорость транскрипции и увеличивая скорость роста и размножения. Тонкая регуляция генома здесь отходит на второй план, так как условия среды внутри хозяина всегда стабильны.

<sup>15</sup> Возможен и третий выход: в геноме *E. coli* описан комплекс генов *mazF*, *mazE*, *relA*, кодирующих стойкий токсин, нестойкий антитоксин (подавляющий активность токсина или разрушающий его) и регуляторный белок, соответственно. В голодающих клетках синтез *mazE* и *mazF* подавлен, антитоксин быстро разрушается, что приводит к их гибели, уменьшая конкуренции бактерий за субстрат, и насыщая его биогенами погибших бактерий. Функционально аналогичные гены имеются и у *B. subtilis*, причем регуляция их экспрессии связана с инициацией споруляции. В итоге, часть клеток начинает споруляцию, а часть гибнет, освобождая будущие поколения от конкуренции.

<sup>16</sup> Общеупотребительный термин “некодирующая ДНК” не совсем корректен. Как правило, под ним понимают ДНК, которая не транскрибируется и не кодирует ни белки, ни РНК. Вопрос о том, существует ли в организме ДНК, которая вообще ничего не кодирует остается открытым.



200 п.н.), что благоприятствует рекомбинации. Наконец, при высокой скорости роста инициация нового раунда репликации может начаться еще до завершения предыдущего (слайд 21) и образуются “многоуровневые” вилки. Гормогонии цианобактерий (слайд 21) как раз характеризуются частыми делениями без роста клеток. Регуляторные районы насыщены повторами. Развитие оперонной организации генома позволяет минимизировать число регуляторных районов. Геномные проекты показывают, что доля повторов в геномах бактерий крайне незначительна (слайд 22-23).

Опасность цис-мутаций в регуляторных районах оперонов в сочетании с опасностью делеций вследствие рекомбинации по повторам можно объяснить тот факт, что только 9% оперонов *E.coli* несут дубликации сайтов связывания в регуляторных районах и в 7% обнаружена дубликация вместе с регулируемым геном (генами)<sup>17</sup>. Напротив,  $\frac{3}{4}$  транскрипционных факторов *E.coli* несут дубликации в своих активных сайтах. Дубликации в регуляторных районах явно задавлены отбором.

**Аллометрия.** Сложность регуляции зависит от числа регуляторов. Геномные проекты показывают, что рост числа генов и рост числа генов регуляторных молекул связаны не линейно, а аллометрически (слайд 18). Математическое моделирование (Крофт)<sup>18</sup> показывает - чтобы увеличить число генов-регуляторов, надо увеличить число регулируемых единиц (слайд 18-19). Иными словами – разбить опероны на более мелкие регулируемые единицы. Но это должно вызвать рост размера генома, так как каждый ген потребует своего регуляторного района. Рост размера генома запрещен катастрофой мутационных ошибок Эйгена. Таким образом, число генов-регуляторов у бактерий должно быть ограничено сверху. Экзон-интронная структура и альтернативный сплайсинг эукариот обеспечивают огромное число регулируемых единиц без значительного роста числа генов и размеров генома, что позволяет эукариотам отодвинуть верхнюю границу для числа генов-регуляторов. Например, на слайде 20 представлена схема альтернативного сплайсинга гена *DSCAM*. Альтернативный сплайсинг позволяет с одного и того же фрагмента ДНК получать тысячи вариантов белковых молекул.

**Консервативный порядок генов.** Казалось бы, возможен и другой вариант – увеличить число регулируемых единиц за счет разбиения одних оперонов и слияния других. Между тем, с ростом числа генов средние размеры оперонов у бактерий практически не меняются - слишком длинные опероны не обладают нужной гибкостью регуляции. Этим также объясняется редкость оперонов, корегулируемых множеством транскрипционных факторов (см. ниже слайды 30-31, данные по *E.coli*).

Бактерии избрали другой путь – стабилизацию порядка генов (оперонов) в геноме. Стабильность порядка генов в эволюции на порядок ниже стабильности генов в опероне. Тем не менее, служат они одной и той же цели – оптимизации регуляции генов. Сама оперонная структура способствует стабилизации порядка генов в геноме (слайд 24)<sup>19</sup>.

---

<sup>17</sup> Соответственно 28 и 20 дубликаций на 303 оперона. Чаще всего дубликация ограничивается сайтом посадки одного транскрипционного фактора, редко затрагивает два (слайд 31, таблица справа).

<sup>18</sup> Представим геном из  $N$  генов, в котором  $R$  генов-регуляторов. Новые гены к геному могут только добавляться (то есть происходят только дубликации и горизонтальный перенос; сменой функций генов мы в данном случае пренебрегаем – предполагается, что она маловероятна, т.к. все гены жизненно важны). Таким образом, новый ген, появившись, может ненаправленно “дрейфовать” в пространстве взаимодействий со всеми остальными генами с вероятностью  $p$  фиксации отбором любой регуляторной связи. То есть всего для каждого гена может зафиксироваться  $pN$  связей. Часть новоявленных генов может интегрироваться в геном за счет уже существующих регуляторных факторов. Другая часть ( $v$ ) требует новых факторов, то есть их полноценная регуляция требует фиксации  $\Delta R = vpN$  новых регуляторов. Допустим, что скорость эволюции равна  $const$ . Тогда  $vp = const = c$ . Тогда добавление  $\Delta N$  новых генов требует добавления  $\Delta R = cN\Delta N$  новых регуляторов, часть из которых (но не все) также требуют новых регуляторов и т.д., т.е. зависимость аллометрическая. Уравнение на слайде 18-20 начинает “заполнять” пустой геном из расчета – один новый ген на один шаг модели.

<sup>19</sup> Каждая точка графика соответствует сравниваемой паре видов (желтые – паре видов археобактерий, синие – зубактерий, красные – паре бактерия-археобактерия). На рис b представлен вариант того же графика, нормированный с учетом того, что средние скорости эволюции (в заменах нуклеотидов на геном) у археобактерий и зубактерий не совпадают.

Наиболее четко отрегулированные генные сети характеризуются наиболее стабильным порядком генов в эволюции. Как правило гены таких сетей находятся далеко от горячих точек рекомбинации. Интересно, что в число таких точек входят точки инициации и терминации репликации. Возможно это является одной из причин унирепликонной организации генома прокариот. На верхнем рисунке слайда 25 сравнивается порядок расположения генов у *E.coli* и других бактерий, геном которых известен. Зеленой линией отмечена граница между зубактериями (снизу) и археобактериями (сверху), желтыми выделены участки генома с наиболее консервативным порядком генов. Желтые линии вблизи точки инициации репликации (O) отражают сходство последовательностей ДНК, а не порядка генов. На нижнем рисунке аналогично сравнивается порядок генов *Xylella fastidiosa* с другими бактериями. 40% генома *X.fastidiosa* представлено уникальными генами. Соответственно, районы, насыщенные уникальными генами характеризовались наименее консервативным порядком генов (отмечены красными линиями). Исследования показывают, что наиболее консервативные районы генома либо насыщены оперонами, либо имеют аномально высокую концентрацию длинных оперонов (на слайде 26, представлена часть таблицы).

Наконец, поиски в геномах бактерий генов, перенесенных горизонтально от других организмов выявили, что эти “неродные гены” сосредоточены в районах геномов с наименее консервативным порядком генов<sup>20</sup>. Чем больше крупных оперонов в геноме бактерии, тем меньше в ее геноме “неродных генов”. Таким образом, оперонная структура и жесткий порядок генов в геноме, оптимизируя регуляцию, служат защитой от горизонтального переноса, препятствуя тем самым усложнению генома. Кстати, это объясняет, почему в ходе симбиогенеза эукариот генетический материал сосредоточился в ядре, а не оказался равномерно распределенным между всеми участниками эндосимбиоза. Оперонная структура в ядре была разрушена, оптимизация регуляции шла там не за счет структурного сцепления, а за счет тонкой индивидуальной регуляции генов, поэтому встройка генов из органелл не могла нарушить координацию регуляции в генных сетях. Массовый горизонтальный перенос в ядро, по-видимому, был остановлен механически – в процессе эволюционного формирования ядерной оболочки с порами.

Эукариоты используют консервативный порядок генов для оптимизации регулирования генных сетей значительно реже, чем прокариоты. Тем не менее, порядок наиболее жестко корегулируемых генов и у них эволюционно стабилен<sup>21</sup>. Как правило, белковые продукты этих генов тесно (порой физически) взаимодействуют (слайд 27). Необычный, хотя и ожидаемый результат был получен при секвенировании геномов нуклеоморфов хлорарахниофитовых водорослей. Эти протисты приобрели свои хлоропласты не вследствие эндосимбиоза с цианобактериями, а в результате эндосимбиоза с эукариотическими водорослями<sup>22</sup>, ранее вступившими в эндосимбиоз с цианобактериями. В итоге такие хлоропласты несут эукариотическое гаплоидное ядро с тремя хромосомами - нуклеоморф. В нуклеоморфе, наряду с обычными эукариотическими генами<sup>23</sup>, были обнаружены опероны и перекрывающиеся гены, считывающиеся как один цистрон. Их мРНК транслируется после альтернативного сплайсинга.

### Заключение

Теперь попробуем ответить на вопрос, поставленный в начале лекции: как соотносятся (и соотносятся ли вообще) биологический прогресс и биологическая

<sup>20</sup> Кстати, в этих районах аномально высока доля дублированных генов, что можно объяснить двояко: либо горизонтально перенесенные гены чаще дублируются, либо в районах с малоконсервативным порядком генов чаще происходят дубликации. В обоих случаях выходит, что нарушенный порядок генов благоприятствует увеличению сложности генных сетей.

<sup>21</sup> Именно среди таких генов у *Caenorhabditis elegans* были открыты эукариотические опероны. Важным отличием этих оперонов от прокариотических является трансплайсинг мРНК. Возможно, оперонная организация распространена у эукариот шире, чем мы думаем, но ее маскирует трансплайсинг.

<sup>22</sup> По данным молекулярной филогении близкими к хлорелле.

<sup>23</sup> Размер интронов генов нуклеоморфа очень мал.

сложность генных сетей? И так, сама по себе оперонная структура не запрещает усложнения генома и развития тонкой регуляции каждого гена. Катастрофа мутационных ошибок, ограничивающая размер генома сверху, также сама по себе не закрывает пути к усложнению генома, коль скоро у организма есть возможность поступиться в ходе эволюции скоростью репликации каждого репликона и за счет этого увеличить точность репликации и репарации. Но оперонная структура позволяет легко, за счет структурного сцепления, оптимизировать регуляцию генов, что в свою очередь позволяет без особого увеличения сложности<sup>24</sup> интенсифицировать метаболизм. Правда, за это приходится платить жесткостью регулировки, (зарегулированностью), следствием чего будет узкая специализация<sup>25</sup>.

Действительно, в свете последних данных генная сеть *E.coli* предстает перед нами как достаточно сильно зарегулированная система (слайд 28), состоящая из нескольких глобальных каскадов и множества небольших частных регуляторных контуров. В сети, состоящей из 1302 генов, организованный в 303 оперона, насчитывающей 121 транскрипционный фактор, выделены 23 двухступенчатых каскада, 32 трехступенчатых, и только 6 четырехступенчатых. 121 транскрипционный фактор регулируют от 1 до 197 генов. При этом 38 регулируемых генов являются сами транскрипционными факторами, 34 – авторегуляторами. Фактор CRP регулирует 18 транскрипционных факторов и себя самого, факторы FNR и ArcA – по 4 транскрипционных фактора, FIS и IHF – по 3, но при этом кооперируются с другими транскрипционными факторами (чем и объясняется их положение на графике слайда 29). Всего выявлено 15 факторов, которые регулируют гены как прямо, так и косвенно, 8 из них могут как активировать, так и репрессировать гены. Только 1 оперон корегулировался 7 транскрипционными факторами, 1 оперон – 6, 4 оперона – 5, двумя факторами корегулировался 101 оперон (слайд 30). Сильно распространена корегуляция – только 26 транскрипционных факторов не взаимодействуют с другими факторами (слайд 31, таблица слева).

Зато интенсификация метаболизма позволяет быстро размножаться со всеми вытекающими отсюда эволюционными преимуществами. Такие организмы должны быстро эволюционировать, захватывать новые экологические ниши и, пока их геномы находятся далеко от границы мутационных ошибок, успешно наращивать свою сложность. Можно предположить, что такое наращивание будет в основном происходить за счет горизонтального переноса. Дупликация гена в хорошо оптимизированном

---

<sup>24</sup> А то и путем упрощения – аналогичная эволюция ряда эукариот – паразитов и/или эндосимбионтов привела к конвергентному появлению в их геномах особенностей, свойственных эубактериям (утрача или сокращение длины интронов, слияние генов в опероны). Археобактерии, как известно, имеют интроны. Возможно эволюционная стратегия интенсификации метаболизма в стабильных условиях, принятая эубактериями, вызвала утрату у них интронов. Альтернативная гипотеза предполагает позднее появление интронов, как следствие ретротранспозиции мобильных элементов. В заорганизованном оперонном геноме эубактерий такая ретротранспозиция могла принести лишь вред и выбраковывалась отбором. Напротив, археобактерии и особенно эукариоты смогли “наладить” с ее помощью еще один уровень регуляции генных сетей.

<sup>25</sup> Популярное мнение о неспециализированности и, как следствие - неприхотливости прокариот вообще и эубактерий в частности не совсем корректно и смешивает как минимум три понятия. Во-первых, прокариоты действительно освоили такие метаболические пути, которые не описаны у эукариот. Но и в этом случае, например литотрофные бактерии остаются узкими специалистами. Во-вторых, действительно, прокариоты способны выдерживать значительные перепады температур, солености и т.д., но, при этом они останавливают свой метаболизм, образуя покоящиеся формы. Как индивидуальные организмы прокариоты в этом более специализированы, чем эукариоты, которые приспособляются, не останавливая метаболизма и меняя экспрессию генных сетей: биохимических, физиологических, поведенческих. На самом деле, на Земле есть единственный биотоп, который эукариоты в принципе не могут освоить – это гипертермофильные воды. Совмещение транскрипции и трансляции позволяет археобактериям считывать с мРНК информацию до того, как она распадется при высокой температуре. Эубактерии также не могут освоить гипертермофильные воды, хотя и по другим причинам (денатурация экзоскелета и мембраны). В третьих, высокая приспособляемость популяций прокариот – следствие огромной преобладающей генотипической изменчивости. Напротив, популяции эукариот приспособляются, за счет фенотипической изменчивости, регулируя экспрессию генных сетей.

гаплоидном геноме нарушит всю регуляцию прежде, чем дублированный ген приобретет новую функцию. Как мы видели, такие дубликации редки. Другое дело - перенос готового оперона с новой функцией. Но по мере того, как регуляция все более и более заорганизовывается, любые крупные генетические новации в ней приносят больше вреда, чем пользы - оперонная структура начинает препятствовать горизонтальному переносу. Наконец размеры геномов бактерий приближаются к границе мутационной катастрофы ошибок, и дальнейший рост сложности требует дезинтеграции оперонов, что уже невозможно сделать без ущерба для оптимальности регуляции и скорости размножения. Тупик специализации, из которого бактерии (надо отдать им должное) нашли великолепный выход - сопряженный метаболизм. Отходы жизнедеятельности бактерий одного вида становятся пищей для другого<sup>26</sup>. Бактерии формируют биопленки и бактериальные маты. Биопленка состоит из внеклеточного полисахаридного матрикса, формируемого одними бактериями и заселяемого другими. Пустоты в матриксе создают своеобразную проводящую систему, по которой перемещаются вещества по градиентам концентрации и/или мигрируют бактерии. Нетрудно заметить, что биопленка разрешает все противоречия бактериальной организации: рост сложности ничем не ограничен - совокупный геном (метагеном) биопленки состоит из геномов всех ее бактерий, посему полирепликонен, полиплоиден, содержит массу регуляторных единиц, а значит, не попадает под ограничения Эйгена и Крофта. Как правило, биопленки прикреплены к субстрату, поэтому ток жидкости вокруг них препятствует образованию "биогенной пустыни". Большая часть известных прокариот в природе существуют в составе биопленок<sup>27</sup>, в которых наряду с ними часто обитают грибы и реже - протисты<sup>28</sup>.

Что же помешало на базе биопленки сформировать подвижные организмы? На наш взгляд это децентрализация метагенома. Распределенный по многочисленным организмам, видовой состав которых к тому же варьирует, метагеном не может регулировать метаболизм биопленки иначе как пассивным градиентом метаболитов. Для многоклеточного организма этого мало - ему необходимы специфические сигналы межклеточной коммуникации. Аналогом межклеточной коммуникации у бактерий являются так называемые кворум-чувствительные сигналы<sup>29</sup>. На слайде 33 представлены моменты формирования плодовых тел у миксобактерий. В образовании плодовых тел важную роль играют А-сигналы, экспрессируемые в среду при голодании и С-сигналы, экспрессируемые на особые пили. По достижении в среде определенной концентрации А-сигналов, бактерии собираются вместе, контактируют пилиями (слайд 33, верхнее фото) и перестают делиться. С-сигналы запускают формирование плодового тела (слайд 33, нижнее фото). Важный момент - во время образования плодового тела деление

<sup>26</sup> Сопряженный метаболизм организуют не только бактерии разных видов, но и разных штаммов одного вида. Даже в простой чашке Петри формируются две популяции - пристеночная и центральная, между которыми возникает сопряженный метаболизм.

<sup>27</sup> Интереснейшим примером сопряженного метаболизма прокариот служит цианобактериальный мат - плотный "ковёр" ~до 2 см толщиной, состоящий из нескольких функциональных слоев: 1) верхний слой - поверхность роста из автотрофных цианобактерий и аэробных гетеротрофов, утилизирующих кислород и отмершую/выпавшую на поверхность мата органику; 2) подкладка из неокислородных фотосинтетиков, утилизирующих световую энергию, неиспользуемую цианобактериями, и факультативных аэробов-гетеротрофов; 3) афотическая зона из анаэробов, утилизирующих все, что осталось. Метаболизм мата настолько сопряжен, что экспериментальное уничтожение аэробов тут же приводит к блокаде развития фотосинтетиков, вследствие отравления кислородом. Цианобактериальный мат - самая сбалансированная из известных экосистем: он производит ровно столько органики и кислорода, сколько тут же расходует в процессе жизнедеятельности (нулевой баланс) Фотосинтетики подкладки используют пигменты, поглощающие свет иной части спектра, чем пигменты цианобактерий. Поскольку спектр меняется в течение суток ("покраснение" Солнца на восходе и закате), в мате происходят упорядоченные вертикальные миграции бактерий с разными типами пигментов. Цианобактериальные маты долгое время оставались господствующей формой жизни на Земле, окончательно уступив господство эукариотам только в начале кембрия.

<sup>28</sup> 60-70% массы живой губки составляют бактерии, на основании чего предложена гипотеза, рассматривающая губки как симбиоз колонии жгутиковых и биопленки прокариот.

<sup>29</sup> Другим аналогом являются описанная выше межклеточная коммуникация при споруляции *B. subtilis*.

заблокировано – у цианобактерий нет механизма контактного торможения, который бы ограничивал и синхронизировал деления клеток. Поэтому образование причудливых структур на слайде 33 идет только путем миграции и апоптоза клеток<sup>30</sup>. Интересный аналог такого механизма обнаружен у *E.coli*. Быстроразмножающиеся мутанты по *groS* сигма-фактору, могут жить только в популяции дикого типа, поскольку имеют дефектный метаболизм. В итоге, после вытеснения мутантом дикого типа гибнет вся популяция. Спонтанный аутолиз у *E.coli* можно объяснить аналогией с апоптозом раковых клеток многоклеточных – кворум-чувствительные сигналы запускают аутолиз быстрорастущей части популяции.

Единственными прокариотическими многоклеточными являются цианобактерии. Филамент (колония) цианобактерии является полноценным организмом, способен двигаться как единое целое и имеет органы (в том числе – органы размножения), состоящие из терминально дифференцированных клеток (см. слайд 21). Например, азотфиксирующие гетероцисты формируются в ответ на азотное голодание. Они неспособны делиться и жить вне филамента, так как не фотосинтезируют. С вегетативными клетками они сообщаются через узкие десмосомы, по которым в них диффундируют продукты фотосинтеза, а из них – глутамин (транспорт азота). На слайде 32 представлена генная сеть формирования гетероцисты, которая гениально проста. Азотный голод вызывает дифференцировку гетероцист, активируя белок *NtcA*, активирующий синтез белков *HetC*, *HetR* и самого себя. *HetC* связан с арестом деления. *HetR* подавляет *HetC*, разрешая синтез ДНК и запуская транскрипцию оперонов азотфиксации, белков *PatS* и *NtcA*. Положительная обратная связь *HetR* → *NtcA* → *HetC* и отрицательные обратные связи *HetR* → *HetC* стабилизируют процесс. Белок *PatS*, благодаря малым размерам (15-17 аминокислот у разных видов цианобактерий), диффундирует в клетки-соседи гетероцисты, подавляя *HetR* (аналог градиента морфогенов эукариот), чем, по-видимому, и исчерпывается межклеточная коммуникация. Расположение гетероцист на филamente таксонспецифично и задается градиентами *PatS* и глутамин. Усложнению межклеточной коммуникации явно мешает клеточная стенка – *PatS*, из-за своих малых размеров имеет низкие эволюционные потенции.

Показано, что у бактерий с многоклеточными стадиями размер генома должен быть не менее 4 млн.п.н. (см. табл на слайде 1). В образовании, поддержании и функционировании гетероцист прямо задействовано около 140, а косвенно - до 1000 генов. За споруляцию *B.subtilis* прямо отвечают 164 гена, косвенно - много больше. За формирование плодового тела миксобактерий прямо отвечают не менее 300 генов, ~200 генов ответственны за таксисы и еще примерно столько же связаны со всем этим косвенно. Таким образом, многоклеточность обеспечивается минимум 1000 генами. Прибавив гены домашнего хозяйства и основного метаболизма, получим нижнюю оценку генома многоклеточного – ~2000 генов. Большой по меркам бактерий геном<sup>31</sup>.

Теперь мы можем предположить, почему только эукариоты развили многоклеточность. Эукариотическая клетка, как и биопленка, представляет собой продукт симбиоза, но только внутреннего (эндосимбиоз). Другим ее важным отличием будет наличие централизованного генома с тонкой регуляцией генов. Выше упоминалось, что зарегулированность и оперонная структура генома препятствуют горизонтальному

<sup>30</sup> Формирование механизма контактного торможения вообще было крепким орешком для эволюции. Например, колониальные протисты типа *Dictyostelium* так и не смогли его сформировать, поэтому клетки в их колониях не размножаются. В истории жизни на Земле механизм контактного торможения формировался считанное число раз, причем последний раз – независимо от всех остальных - у вольвоксовых водорослей ~30 млн.лет назад.

<sup>31</sup> Насколько бактериям трудно поддерживать все это хозяйство в работоспособном состоянии говорит следующий факт: при культивировании нескольких поколений миксобактерий в жидкой среде при избытке ресурсов они теряют способность образовывать плодовые тела и перестают экспрессировать часть генов, ответственных за этот процесс. Только культивирование в течение нескольких поколений на твердом субстрате при недостатке ресурсов “реанимирует” эти гены. Пока неясно, что ответственно за эти процессы – спонтанный мутагенез или длительная модификация.

переносу. В ядре оперонов нет<sup>32</sup>, в органеллах есть. Таким образом, горизонтальный перенос генов более вероятен из органелл в ядро, что и предопределило формирование централизованного генома. С другой стороны, тонкая регуляция генов и точная транскрипция позволили обойти границу Эйгена. (о других деталях симбиогенного происхождения эукариот, роли эндоскелета, универсальных клеточных моторов, фагоцитоза см. в лекциях Н.А. Колчанова). Но что заставило предков эукариот поступиться скоростью транскрипции<sup>33</sup>? Обратимся к данным палеонтологии.

Появление эукариот в палеонтологической летописи (~2,7 млрд лет назад), приурочено к двум важным событиям – достижением точки Пастера (в атмосфере кислород стал составлять 1%<sup>34</sup>) и окончанием формирования земного ядра. Последнее стало причиной всплеска тектонической активности. Конвективные потоки в мантии вздыблили плиты земной коры в единый материк – Монгою. Высотный характер этого материка способствовал развитию сильного покровного оледенения (начавшегося как высокогорное). В дальнейшем Земля за короткое по геологическим меркам время переживет целую серию сильнейших в своей истории оледенений, каждое из которых будет отмечено экспансией эукариот<sup>35</sup> и регрессией прокариотических матов<sup>36</sup>. Накопление кислорода в атмосфере подготовило энергетическую базу для прогрессивной эволюции и вызвало вымирание/сокращение ареалов анаэробных прокариот, “расчистив дорогу” новым видам. С другой стороны, сильное покровное оледенение сократило ареал цианобактериальных матов, хорошо себя чувствующих в теплых мелководных биотопах. Землетрясения и ледники просто сметали бактериальные маты. В таких условиях эволюционные преимущества получал организм с достаточно универсальным метаболизмом, парирующий быстрые изменения окружающей среды без массового вымирания в популяциях и способный “начать жизнь с чистого листа” не привязанный к субстрату и не тратящий время на самосборку наподобие бактериального мата. То есть организм-убиквист<sup>37</sup>, желателно свободноживущий. Эукариоты, с их централизованным геномом и гибкой регуляцией, позволяющей парировать изменения окружающей среды путем изменения регуляции генных сетей, но из-за низкой скорости размножения и расточительного метаболизма<sup>38</sup> оставшиеся на вторых ролях получили эволюционный шанс. И реализовали его.

#### **Выводы:**

**1) Биологический прогресс – это уменьшение вероятности гибели организма (именно каждого организма!) от неопределенных, непредвиденных причин. Он достигается путем автономизации процессов репродукции, жизнедеятельности и передачи информации у организмов от повреждающего влияния внешней среды, или через усиление у организмов способности управлять средой.**

**2) Генетическим базисом биологического прогресса является эволюция регуляторных генетических систем организмов. Усложнение таковых систем может идти по следующим направлениям (1) увеличение числа элементов биосистемы, (2) увеличение числа связей между элементами; (3) рост числа уровней иерархии; (4) рост числа элементов и связей биосистемы, работающих в единицу времени и/или в единицу пространства; и (5) рост разнообразия режимов динамического поведения биосистем**

<sup>32</sup> Пока неясно, гомологичны ли опероны *C. elegans* оперонам прокариот, но насчет оперонов нуклеоморфа можно с большой долей уверенности сказать, что это результат конвергентной эволюции.

<sup>33</sup> Быстрота транскрипции эукариотического генома достигается за счет его полирепликонной организации.

<sup>34</sup> С этого момента переход с брожения на дыхание становится энергетически выгодным.

<sup>35</sup> Формированию первых фаун многоклеточных эукариот – вендской и кембрийской – предшествуют волны оледенений. Вендская фауна отмечена чертами холодноводности.

<sup>36</sup> Наоборот, в межледниковье прокариоты брали реванш, что связывают с потеплением и освобождением мелководий шельфа, ранее занятого языками шельфовых ледников.

<sup>37</sup> Убиквист – неспециализированный организм.

<sup>38</sup> См. сноску 26.

3) Генные сети прокариот и эукариот организованы на общих принципах. Разнится только реализация. Сама по себе прокариотическая оперонная структура не является препятствием для усложнения регуляции генных сетей.

4) Легкость, с какой оперонная структура решает проблему оптимизации регуляции генных сетей (структурное сцепление генов), толкает организмы на путь специализации. Специализация “заопероненного” генома благоприятствует упрощению и потере гибкости (зарегулированности, жесткости) регуляции генных сетей, что делает непреодолимым ограничения на размер генома. Основной эволюционной стратегией становится r-стратегия<sup>39</sup>.

5) Ограничения на размер генома и жесткость регуляции генных сетей мешает горизонтальному переносу и созданию централизованной регуляции. В итоге вершиной прогрессивной эволюции бактерий стали бактериальные маты и биопленки. Создание многоклеточных свободноживущих гетеротрофов со сложным поведением, по-видимому, в принципе невозможно на прокариотической основе.

6) Тонкая регуляция генома эукариотического типа позволяет обойти ограничения на размер генома, благоприятствует освоению k-стратегии и централизованной регуляции как на уровне генома организма, так и на надорганизменном уровне. Избыточность такой регуляции позволяет эволюционировать путем дубликации блоков сети и смены их функций. В итоге, в смысле автономизации от окружающей среды и управления ей, а также в смысле уменьшения вероятности гибели организма (именно каждого организма!) от неопределенных, непредвиденных причин эукариоты достигли уровня на порядок превышающий таковой у прокариот.

Благодарю за внимание.

---

<sup>39</sup> R-стратегия выживания – выживание за счет оставления максимального числа потомков, быстрого размножения и парирования изменений окружающей среды путем изменения генетической структуры популяций (вымирание неприспособленных генотипов и размножение приспособленных). K-стратегия – выживание за счет увеличения вероятности достижения потомками репродуктивного возраста и парирования изменений окружающей среды путем гибкой регуляции генных сетей без существенного вымирания в популяциях.