

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Учебная программа дисциплины

➤ **Конспект лекций**

Лабораторный практикум

Методические указания по самостоятельной работе

Банк тестовых заданий в системе UniTest



УДК 577.1
ББК 28.072
Б63

Авторы:

**Н. М. Титова, А. А. Савченко, Т. Н. Замай, Г. И. Боровкова, Т. Н. Субботина,
Е. В. Инжеваткин**

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Биохимия и молекулярная биология» подготовлен в рамках инновационной образовательной программы «Создание и развитие Департамента физико-химической биологии и фундаментальной экологии», реализованной в ФГОУ ВПО СФУ в 2007 г.

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;
Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

Б63 Биохимия и молекулярная биология. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: конспект лекций / Н. М. Титова, А. А. Савченко, Т. Н. Замай и др. – Электрон. дан. (10 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Биохимия и молекулярная биология : УМКД № 175-2007 / рук. творч. коллектива Н. М. Титова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 10 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-0882-7 (комплекса)

ISBN 978-5-7638-1433-0 (конспекта лекций)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320802400 от 21.11.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Биохимия и молекулярная биология», включающего учебную программу, лабораторный практикум, методические указания к самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Биохимия и молекулярная биология. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Биохимия и молекулярная биология. Презентационные материалы».

Изложены современные представления о структуре и функциях белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, путях биосинтеза и распада этих биополимеров, механизме ферментативного катализа, его регуляции. Даны сведения о важнейших группах ферментов и коферментов, их структуре, участии окислительных ферментов в осуществлении процессов тканевого дыхания, его энергетической эффективности. Особое внимание уделено структуре и механизму действия на обмен веществ витаминов.

Предназначен для студентов направления подготовки бакалавров 020200.62 «Биология» укрупненной группы 020000 «Естественные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Рекомендовано к изданию

Инновационно-методическим управлением СФУ

Редактор В. Р. Наумова

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 22.09.2008

Объем 10 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Оглавление

Введение.....	9
----------------------	----------

Модуль I. Статическая биохимия	11
---	-----------

Лекция 1 Структура, свойства, биологическая роль моно – и олигосахаридов	11
Классификация углеводов.....	11
Моносахариды.....	12
Стереоизомерия моносахаридов.....	15
Представители моносахаридов	16
Олигосахариды.....	18
Отдельные представители дисахаридов	20
Лекция 2 Структура, свойства, биологическая роль гомо – и гетерополисахаридов	21
Отдельные представители полисахаридов	24
Лекция 3 Структура, свойства, биологическая роль простых липидов	26
Классификация.....	26
Воски	28
Нейтральные жиры (триацилглицеролы, триглицериды).....	29
Стероиды	30
Желчные кислоты	32
Лекция 4 Структура, свойства, биологическая роль сложных липидов	33
Лекция 5 Аминокислотный состав белков	40
Белки и их функции.....	40
Элементарный состав белков.....	42
Методы выделения и очистки белков	42
Аминокислотный состав белков.....	44
Химические свойства аминокислот	45
Классификация аминокислот, заменимые и незаменимые аминокислоты	47
Лекция 6 Уровни структурной организации белков	50
Структурная организация белков	50
Первичная структура белка: методы исследования. Структурные особенности пептидной связи	51
Номенклатура пептидов и полипептидов. Природные пептиды: глутатион, карнозин, ансерин, грамицидин S, окситоцин, энкефалины	52
Вторичная структура белков: α -спираль, ее основные характеристики, β -структура, β -изгиб. Роль водородных связей в формировании вторичной структуры. Сверхвторичные (надвторичные) структуры белка	55
Третичная структура белков. Типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру. Роль S-S-мостиков в формировании третичной структуры некоторых белков.....	58
Четвертичная структура белков. Количество и типы субъединиц. взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру.	
Функциональное значение четвертичной структуры белков.....	60

Лекция 7 Физико-химические свойства белков	62
Ионизация, гидратация, растворимость, осмотические и онкотические свойства, оптические свойства	62
Молекулярная масса и размеры белков. Методы определения молекулярной массы белков. Необходимость применения комплекса методов для точной оценки молекулярной массы белков.....	64
Денатурация белков.....	67
Лекция 8 Классификация белков. простые и сложные белки	68
Принципы классификации белков	68
Фибриллярные белки.....	68
Глобулярные белки.....	70
Сложные белки.....	70
Лекция 9 Сложные белки	79
Гликопротеины	79
Фосфопротеины	83
Липопротеины.....	83
Металлопротеины	85
Лекция 10 Строение, свойства, биологическая роль нуклеотидов	87
Циклические нуклеотиды.....	92
Лекция 11 Строение, свойства, биологическая роль нуклеиновых кислот	93
Транспортные РНК.....	101
Матричные РНК.....	102
Рибосомальные РНК.....	103
Лекция 12 Витамины – биологическая роль, классификация.	
Водорастворимые витамины	105
Витамин В ₁ (тиамин)	107
Витамин В ₂ (рибофлавин)	108
Витамин В ₃ (РР, никотиновая кислота, никотинамид)	109
Витамин В ₅ (пантотеновая кислота)	110
Витамин В ₆ (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин).....	111
Витамин В ₉ (фолиевая кислота)	112
Витамин В ₁₂ (кобалами).....	113
Витамин Н (биотин).....	114
Витамин С (аскорбиновая кислота)	115
Витамин Р (рутин)	116
Лекция 13 Жирорастворимые витамины	117
Витамин А (ретинол)	117
Витамин D (кальциферол).....	119
Витамин Е (токоферол)	121
Витамин К (нафтохинон).....	122
Лекция 14 Ферменты – строение: свойства, механизм действия	123
Понятие о ферментах. Сущность явлений ферментативного катализа	123
Структурная организация ферментов	125
Изоферменты: биологическая роль	135
Механизм действия ферментов.....	138

Специфичность действия ферментов.....	141
Стационарная кинетика ферментативных реакций.....	144
Единицы ферментов.....	152
Лекция 15 Регуляция ферментативной активности. Классификация ферментов.....	154
Активирование и ингибирование ферментов.....	154
Активаторы ферментов.....	154
Ингибиторы ферментов.....	154
Регуляция каталитической активности ферментов.....	160
Классификация и номенклатура ферментов.....	166
Ферменты в клинической диагностике. Энзимопатии.....	169

Модуль II. Динамическая биохимия 170

Лекция 16 Обмен веществ и энергии в живых системах. Расщепление углеводов в пищеварительном тракте.....	170
Понятие метаболизма. Центральные и специальные метаболические пути.....	170
Катаболические, анаболические, амфиболические пути.....	172
Метаболизм углеводов.....	175
Расщепление углеводов в пищеварительном тракте.....	176
Всасывание моносахаридов в тонком кишечнике и их дальнейший транспорт. Глюкозные транспортеры.....	181
Лекция 17 Анаэробный катаболизм углеводов.....	185
Анаэробное окисление глюкозы. Гликолиз. Внутриклеточная локализация процесса.....	185
Отдельные реакции гликолиза, их термодинамические характеристики.	
Образование 2,3-дифосфоглицерата в шунте Рапопорта-Люберинга.....	187
Расщепление гликогена (гликогенолиз). Строение, механизм действия и регуляция гликогенфосфорилазы.....	194
Спиртовое и молочнокислое брожение.....	199
Лекция 18 Аэробный катаболизм углеводов (часть 1).....	200
Аэробный метаболизм пирувата. Митохондрии: структура и энергетические функции.....	200
Окислительное декарбоксилирование пирувата. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса. Суммарное уравнение и энергетический баланс окислительного декарбоксилирования пирувата. Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса: ковалентная модификация, аллостерический механизм.....	201
Цикл лимонной кислоты. Отдельные реакции цикла, их термодинамические характеристики. Суммарное уравнение окисления ацетил-СоА в цикле Кребса.....	202
Лекция 19 Аэробный катаболизм углеводов (часть 2).....	207
Регуляция цикла Кребса на уровне цитратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса.....	207
Амфиболическое значение цикла Кребса. Необходимость анаплеротических путей, пополняющих запас компонентов, участвующих в цикле.....	209

Зависимое от АТФ и биотина карбоксилирование пирувата: анаплеротический путь синтеза оксалоацетата	212
Пентозофосфатный путь (гексозомонофосфатный шунт)	214
Отдельные реакции ПФП, их термодинамические характеристики. Суммарное уравнение пентозофосфатного пути. Регуляция пентозофосфатного пути на уровне глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	215
Участки перекреста ПФП с гликолизом	218
Циклический характер ПФП	219
Лекция 20 Биосинтез углеводов	220
Глюконеогенез	222
Лекция 21 Расщепление пищевых и тканевых липидов	226
Катаболизм липидов	228
Всасывание продуктов расщепления липидов	231
Транспорт липидов	233
Метаболизм глицерола	234
Лекция 22 Катаболизм жирных кислот	234
Активация жирной кислоты	235
Транспорт ацил-СоА в митохондрии	236
β -окисление жирных кислот	237
Катаболизм ненасыщенных жирных кислот	240
Катаболизм жирных кислот с нечетным числом атомов углерода	241
Образование кетоновых тел (кетогенез)	242
Кетоновые тела как источники энергии	244
Глиоксилатный цикл	245
Лекция 23 Биосинтез жирных кислот и триацилглицеролов	247
Строение синтазы жирных кислот	247
Механизм синтеза жирных кислот	250
Транспорт ацетил-СоА из митохондрий в цитозоль	250
Образование малонил-СоА	251
Наращивание (элонгация) углеродной цепи жирной кислоты	253
Синтез других предельных и непредельных ЖК	255
Биосинтез триацилглицеролов	258
Лекция 24 Биосинтез холестерина и желчных кислот	260
Биосинтез холестерина	260
Регуляция биосинтеза ХС	265
Биосинтез желчных кислот	266
Лекция 25 Биологическое окисление	268
Роль высокоэнергетических фосфатов в биоэнергетике. Биологическая роль АТФ. Свободная энергия гидролиза АТФ и других органических фосфатов	268
Биологическое окисление. Ферменты, участвующие в биологическом окислении	269
Свободное окисление и его биологическая роль. Цитохром Р-450	272
Лекция 26 Субстратное и окислительное фосфорилирование. Дыхательная цепь	273

Окисление, сопряжённое с фосфорилированием ADP. Окислительно-восстановительные потенциалы дыхательных переносчиков. Субстратное фосфорилирование на примере реакций, катализируемых глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и енолазой. Понятие энергетического заряда клетки... 273	273
Цепь переноса электронов и протонов внутренней мембраны митохондрий (дыхательная цепь, редокс-цепь). Компоненты дыхательной цепи: флавопротеины, железосерные белки, коэнзим Q, цитохромы <i>b</i> , <i>c</i> ₁ , <i>c</i> , <i>aa</i> ₃ . Топография дыхательных переносчиков в редокс-цепи 277	277
Энергетическое значение ступенчатого транспорта электронов от окисляемых субстратов к молекулярному кислороду. Окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи 283	283
Организация компонентов дыхательной цепи в виде четырех комплексов: NADH-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, цитохромов <i>bc</i> ₁ , цитохромоксидазы. Роль коэнзима Q и цитохрома <i>c</i> в интеграции комплексов. Коллекторная функция NAD ⁺ и коэнзима Q в дыхательной цепи. Коэффициент окислительного фосфорилирования P/O, P/2e 285	285
Локализация пунктов сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи на основании редокс-потенциалов, действия специфических ингибиторов (ротенон, амитал, антимицин А, цианид, CO, NaN ₃) 289	289
Полные и редуцированные дыхательные цепи 290	290
Лекция 27 Механизмы образования и использования АТФ в живых системах 291	291
Представления о механизмах сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Хемиосмотическая теория Митчелла. Электрохимический протонный градиент как форма запасаения энергии..... 291	291
Строение АТФ-синтазного комплекса. Механизм образования АТФ. Обратимость реакции, катализируемой АТФ-синтазой. Разобщение транспорта электронов и синтеза АТФ; действие 2,4-динитрофенола 292	292
Механизм образования АТФ..... 295	295
Окисление цитоплазматического NADH в дыхательной цепи. Глицеролфосфатный и малат-аспартатный челночные механизмы..... 296	296
Лекция 28 Интеграция клеточного метаболизма 298	298
Основные аспекты регуляции метаболизма 300	300
Регуляция на уровне транскрипции..... 301	301
Аллостерическая регуляция активности ферментов..... 301	301
Ковалентная модификация ферментов 302	302
Гормональная регуляция..... 303	303
Посттранскрипционная и посттрансляционная модификация макромолекул..... 304	304
Изменение концентрации метаболитов 304	304
Мембранная регуляция 305	305
Модуль III. Молекулярная биология..... 307	307
Лекция 29 Репликация ДНК 307	307
Точность репликации 314	314
Репликация ДНК у эукариот 315	315

Репаративный синтез ДНК	316
Лекция 30 Транскрипция (биосинтез РНК)	317
Транскрипция у прокариот.....	319
Инициация транскрипции	320
Элонгация транскрипции	322
Терминация транскрипции	323
Транскрипция у эукариот.....	324
Процессинг первичных транскриптов РНК.....	325
Регуляция генной экспрессии на уровне транскрипции.....	327
Механизм индукции на примере <i>Lac</i> -оперона	329
Катаболитная репрессия	330
Лекция 31 Трансляция (биосинтез белка)	331
Система активации и транспорта аминокислот в рибосомы.....	332
Роль тРНК в трансляции	333
Аминоацил-тРНК-синтетазы	333
Белоксинтезирующая система клетки.....	334
Инициация трансляции.....	335
Элонгация трансляции	338
Терминация трансляции.....	341
Эффективность трансляции.....	342
Точность белкового синтеза.....	342
Энергетические затраты на трансляцию	342
Посттрансляционные модификации полипептидной цепи.....	342
Библиографический список.....	345
Основная литература.....	345
Дополнительная литература	346

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия, или **биологическая химия**, – это наука, которая изучает состав, строение, свойства веществ живой природы, а также их превращения в процессе жизнедеятельности живых объектов с целью познания молекулярных основ жизни.

Термин биохимия был введен Карлом Нейбергом в 1903 г. Название этой науки свидетельствует о том, что она связана как с биологией, так и с химией: **биохимия** – это химия, поскольку она изучает строение, состав, свойства и превращение веществ, а биологическая потому, что изучает только те вещества, которые встречаются и подвергаются превращениям в живой природе.

В зависимости от подхода к изучению живой материи биохимию делят на статическую, динамическую и функциональную. *Статическая* изучает химический состав организмов – состав, строение, количественное содержание в тех или иных биологических объектах. *Динамическая* изучает превращения химических соединений и взаимосвязанных с ними превращений энергии в процессе жизнедеятельности живых организмов. *Функциональная* выясняет взаимосвязь между строением химических соединений и процессами их превращений с одной стороны и функцией субклеточных структур, специализированных клеток, тканей или органов, включающих в состав упомянутые вещества – с другой. Деление это в значительной мере условно и три раздела тесно переплетаются друг с другом.

В зависимости от объекта или направления исследований современная биохимия распадается на следующие самостоятельные разделы: 1) общая биохимия; 2) биоорганическая химия; 3) биохимия животных; 4) биохимия растений; 5) биохимия микроорганизмов; 6) медицинская биохимия; 7) ветеринарная биохимия; 8) техническая биохимия; 9) эволюционная биохимия; 10) радиационная биохимия; 11) космическая биохимия; 12) энзимология; 13) молекулярная биология.

В развитии биохимии выделяют три периода. *Донаучная биохимия* – период накопления практических знаний (сыроварение, приготовление вин, выделка кож, выпечка хлеба и др.), делящийся с древних времен до середины XIX столетия.

Классическая биохимия – период выделения из физиологии в качестве самостоятельной науки (вторая половина XIX века). Ее возникновение связано со стремлением объяснить физиологические процессы с помощью химических реакций. Исследования физиологических процессов в этот период осуществлялись на организменном, тканевом и клеточном уровнях. Важнейшее достижение – установление общего плана строения главных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот) и основных путей химических превращений веществ в живых организмах.

Современная биохимия возникла на базе классической во второй половине XX века в связи с переходом биохимических исследований на качест-

венно новый уровень – молекулярный. Этому способствовало в первую очередь применение новых физико-химических методов (рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, газовая, жидкостная хроматография, метод меченых атомов, ИК- и УФ-спектрофотометрия, флюоресцентный, биолюминесцентный анализ, электрофорез, масс-спектрометрия, ультрацентрифугирование, ЯМР, ЭПР и др.).

Выдающиеся достижения этого периода – открытие двухцепочечной спирали ДНК, расшифровка генетического кода, определение трехмерной структуры ряда белков, описание основных путей метаболизма углеводов, липидов и белков, механизма образования АТФ в клетках, разработка методов определения первичной структуры белков и нуклеиновых кислот, синтез гена и др.

В свою очередь это привело к возникновению нового направления современной биохимии – *молекулярной биологии*, которое интегрировало усилия биологов, биохимиков, химиков и физиков в области изучения молекулярных основ эволюции, дифференцировки, биоразнообразия, развития и старения, канцерогенеза, иммунитета и др.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что биохимия и молекулярная биология в целом изучает химические и физико-химические процессы, лежащие в основе развития и функционирования живых систем всех уровней организации.

Объединение биохимии и молекулярной биологии в одном курсе лекций оправдано. Предметы их изучения очень близки, а последние достижения и история развития современной биохимии и молекулярной биологии не позволяют однозначно ответить на вопрос о том, где заканчивается сфера интересов одной и начинается сфера интересов другой науки. С развитием методов генетической и белковой инженерии, биоинформатики биохимия и молекулярная биология идут параллельным курсом, дополняя и обогащая друг друга.

Биохимия и молекулярная биология переживают сегодня этап стремительного развития. Достижения именно этих и некоторых смежных наук позволили человеку вплотную приблизиться к возможности реконструкции геномов, воспроизведению по сути, любых организмов с заданными свойствами.

Курс лекций состоит из трех модулей, два из которых – статическая и динамическая биохимия рассматривают вопросы, касающиеся строения, свойств и метаболизма основных органических соединений, встречающихся в биообъектах. В третьем модуле охарактеризованы закономерности воспроизведения наследственной информации и механизмы экспрессии генов.

МОДУЛЬ I. СТАТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Лекция 1

Строение, свойства, биологическая роль моно – и олигосахаридов

Углеводы, или сахара, – это органические соединения, которые содержат в молекуле одновременно карбонильную (альдегидную или кетонную) и несколько гидроксильных (спиртовых) групп. Другими словами, углеводы – это альдегидоспирты (полиоксиальдегиды) или кетоноспирты (полиоксикетоны).

Углеводы играют чрезвычайно важную роль в живой природе, и являются самыми распространенными веществами в растительном мире, составляя до 80 % сухой массы растений. Важное значение углеводы имеют и для промышленности, поскольку они в составе древесины широко используются в строительстве, производстве бумаги, мебели и других товаров.

Более подробно о биологическом значении углеводов мы поговорим позднее, а пока рассмотрим их номенклатуру и классификацию.

Название «углеводы» было предложено в 1844 г. профессором Дерптского (Тартуского) университета К. Шмидтом. Оно обязано своим появлением соотношению водорода и кислорода, которое было обнаружено в молекулах первых открытых углеводов. Оно такое же, как и у воды. Поэтому первые исследователи углеводов рассматривали их как соединения углерода с водой. Это название сохранилось и широко используется в настоящее время. Используется оно и в английском языке, в котором углеводы обозначаются словом *Carbohydrates*.

Классификация углеводов

Все углеводы можно разделить на две большие группы: простые углеводы (моносахариды, или монозы) и сложные углеводы (полисахариды, или полиозы).

Простые углеводы не подвергаются гидролизу с образованием других, еще более простых углеводов. При разрушении молекул моносахаридов можно получить молекулы лишь других классов химических соединений. В зависимости от числа атомов углерода в молекуле, различают тетозы (четыре атома), пентозы (пять атомов), гексозы (шесть атомов), и т.д. Если моносахариды содержат альдегидную группу, то они относятся к классу альдоз (альдегидоспиртов), если кетонную – к классу кетоз (кетоноспиртов).

Сложные углеводы, или полисахариды, при гидролизе распадаются на молекулы простых углеводов.

Сложные углеводы, в свою очередь, делятся на олиго – и полисахариды.

Олигосахариды – это низкомолекулярные сложные углеводы, растворимые в воде и сладкие на вкус. Полисахариды – это высокомолекулярные

углеводы, образованные более чем из 20 остатков моносахаридов, не растворимые в воде и не сладкие на вкус.

В зависимости от состава, сложные углеводы можно разделить на две группы:

- 1) гомополисахариды, состоящие из остатков одного и того же моносахарида;
- 2) гетерополисахариды, состоящие из остатков различных моносахаридов.

Кроме того, в живых организмах широко распространены соединения углеводов с веществами других классов. Аминосахара – соединения углеводов с аминами (например, глюкозамин). Гликопротеины и протеогликианы – соединения углеводов с белками, гликолипиды – соединения углеводов с липидами. Наконец, нуклеиновые кислоты ДНК и РНК также представляют собой сложные молекулы, в состав которых входит углеводный компонент.

Моносахариды

Общая формула моносахаридов – $C_nH_{2n}O_n$. Названия моносахаридов образуют из греческого числительного, соответствующего числу углеродных атомов в данной молекуле, и окончания *-оза*. Чаще всего в живой природе встречаются моносахариды с пятью и шестью углеродными атомами – пентозы и гексозы. В зависимости от характера карбонильной группы, входящей в состав моносахаридов (альдегидная или кетонная), моносахариды делятся на альдозы (альдегидоспирты) и кетозы (кетоноспирты). Из гексоз наиболее широко распространены глюкоза (виноградный сахар) и фруктоза (фруктовый сахар). Глюкоза – это представитель альдоз, а фруктоза – кетоз.

Глюкоза и фруктоза являются изомерами, т.е. они имеют один и тот же атомарный состав и их молекулярная формула одинакова ($C_6H_{12}O_6$). Однако пространственное строение их молекул различается:

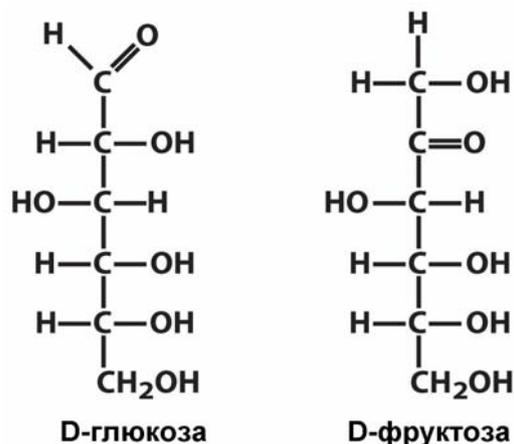


Глюкоза (альдогексоза)



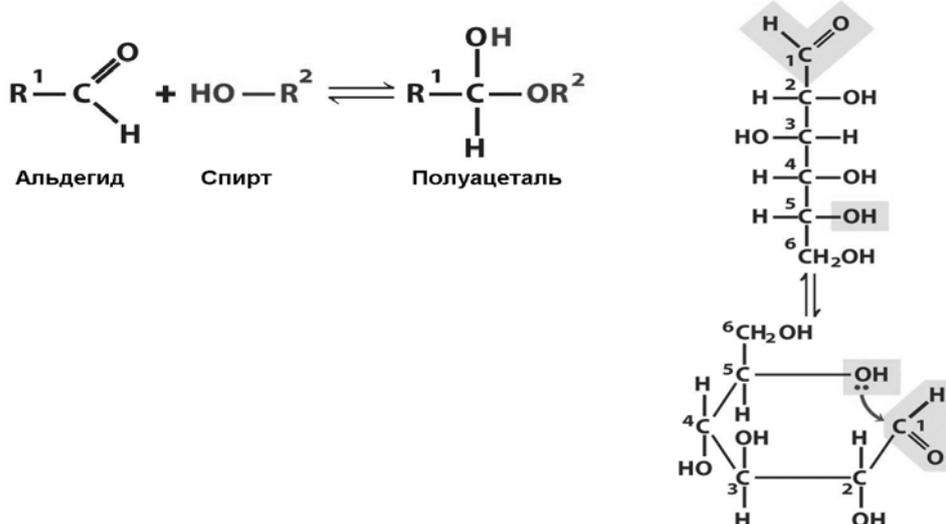
Фруктоза (кетогексоза)

Несмотря на то, что приведенные выше формулы дают представление о различиях между глюкозой и фруктозой, из них нельзя понять, как относительно друг друга и углеродного скелета ориентированы в пространстве атомы водорода и гидроксильные группы в обеих молекулах. Э.Фишер разработал пространственные формулы, названные его именем. Примеры даны ниже.



В этих формулах углеродные атомы нумеруют с того конца цепи, к которому ближе карбонильная группа. В частности, в альдозах первый номер присваивается углероду альдегидной группы.

Однако моносахариды существуют не только в виде открытых форм, но и в виде циклов. Эти две формы – цепная и циклическая – являются таутомерными и способны самопроизвольно переходить одна в другую в водных растворах. Цепная форма содержит в свободном виде альдегидную или кетонную группу, циклическая форма таких групп не содержит. Циклическую форму часто называют полуацетальной из-за ее сходства с полуацетальными веществами, которые образуются при взаимодействии альдегидов со спиртами:



Глюкоза в водном растворе существует в трех формах, способных переходить одна в другую: открытой, альдегидной, и двух циклических (шести – и пятичленной). Фруктоза в водном растворе существует в виде открытой, кетонной формы, и в виде двух циклических (шести – и пятичленной). Образование четырехчленной циклической формы моносахаридов невозможно из-за ограничений на угол изгиба молекулы.

Циклические формулы моносахаридов называют формулами Хеуорза.

Равновесие трех форм углеводной молекулы может наблюдаться только в водных растворах, тогда как в кристаллическом состоянии моносахари-

ды имеют строение преимущественно шестичленных циклических форм. В водных растворах моносахариды также находятся преимущественно в циклических формах. Так, например, в водном растворе глюкозы на долю открытой формы приходится лишь 0,024% молекул.

Циклическая форма образуется при переходе атома водорода гидроксильной группы пятого или четвертого атома углерода молекулы моносахарида к кислороду карбонильной группы. При этом образуется новая гидроксильная группа, получившая название полуацетальной, или гликозидной. Эта гидроксильная группа отличается повышенной реакционной способностью по сравнению с другими гидроксильными группами молекулы.

В пространстве циклическая форма моносахаридов имеет несколько изогнутый вид, напоминающий форму кресла, из-за чего такая конформационная структура получила название «кресло». Кроме того, возможны и другие конформационные структуры моносахаридов, см. [рис. 1.1 а – в](#)

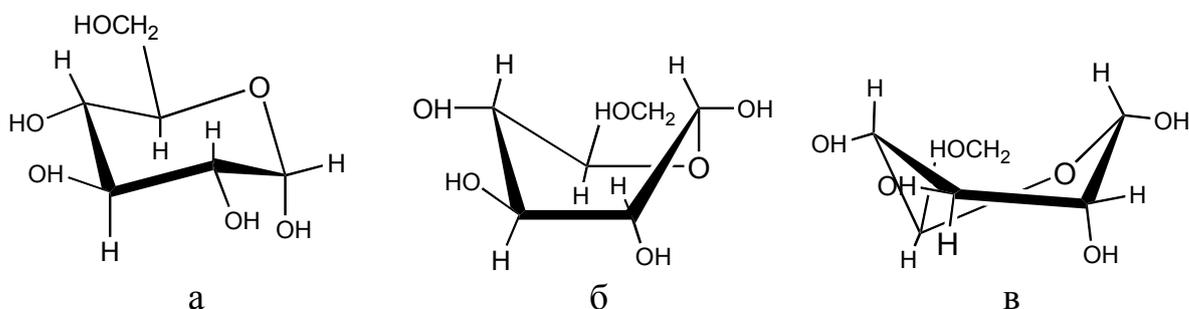
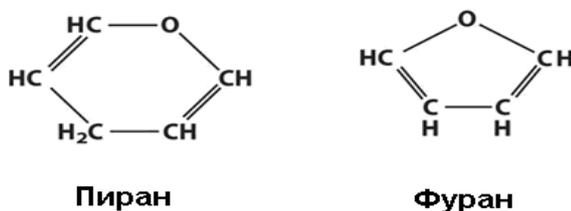


Рис. 1.1. Конформационные структуры моносахаридов:
а – кресло; б – лодка (ванна); в – твист

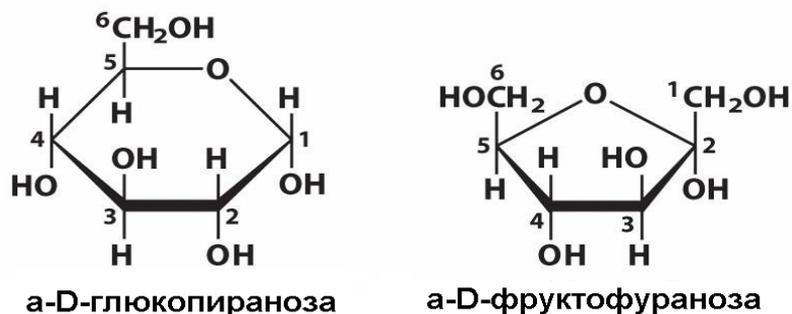
Шестичленные циклические молекулы моносахаридов называют пиранозами, а пятичленные – фуранозами. Эти названия происходят от названий соответственно шестичленного гетероцикла пирана и пятичленного гетероцикла фурана:



От того, в какой форме находится молекула моносахарида – открытой или циклической, – зависят ее химические свойства. Монозы в открытой форме вступают в реакции как альдегиды либо кетоны, а для молекул, находящихся в циклической форме, будут характерны свойства спиртов.

Строение моносахаридов, находящихся в циклической форме, удобно изображать с помощью несколько измененных формул Хеуордса, когда грани

плоскости кольца, приближенные к читателю, выделяются более жирными линиями. При этом символы атомов углерода, составляющих скелет молекулы, обычно не пишут:



Стереои́зомерия моносахаридов

В состав молекул моносахаридов входит несколько асимметрических атомов углерода. Вследствие этого для моносахаридов характерно большое число стереоизомеров. Стереои́зомерия, или, как ее еще называют, пространственная изомерия, делится на геометрическую и оптическую изомерию. Первая связана с существованием *цис* – и *транс* – изомеров.

Явление оптической изомерии связано с тем, что некоторые вещества способны изменять плоскость поляризации проходящего через них поляризованного света. Такая способность объясняется несимметричным строением молекул. Несимметричность молекул моносахаридов как раз и связана с наличием асимметрических химических групп. Такие группы содержат одинаковые атомы, но расположение этих атомов таково, что группы не имеют никаких элементов симметрии. Группы атомов углеводов обладают свойством асимметричности в том случае, если к атому углерода присоединены 4 различных атома или группы. Такие две группы отличаются одна от другой так, как отличается предмет от своего зеркального отражения (рис. 1.2). Вследствие этого такой вид изомерии получил еще название «зеркальной изомерии», а молекулы, отличающиеся друг от друга, как предмет от своего зеркального отражения, назвали хиральными (от гр. *χειρ* – рука) поскольку таким же образом соотносятся друг с другом две ладони. Для обозначения вращений плоскости света используют знаки (+) и (–), а для информирования об относительном пространственном положении групп у асимметрического атома используют обозначения D и L. При этом буквы D и L указывают на конфигурацию групп относительно асимметрического центра, наиболее удаленного от карбонильной группы молекулы. Для гексоз таким атомом является углерод C₅.

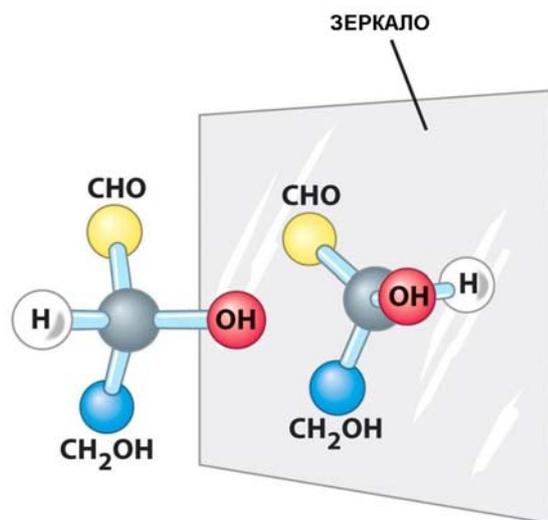
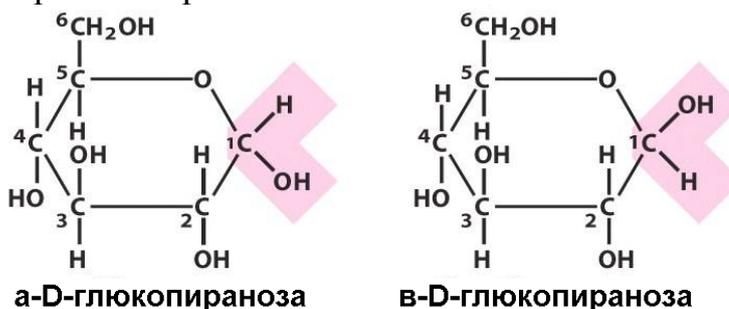


Рис. 1.2. Несовместимость оптических изомеров

Как уже говорилось, в состав моносахаридов входит несколько асимметрических атомов углерода. Так, альдоза, находящаяся в открытой форме, имеет 4 таких атома: со второго по пятый. Вследствие этого число возможных изомеров для нее равно 4^2 , т.е. 16. Среди этого количества изомеров будет 8 пар антиподов D- и L- ряда. Так, природной D-глюкозе соответствует синтетически полученный антипод L-глюкоза.

В случае циклической формы молекулы моносахарида число стереоизомеров вырастает еще вдвое. Дело в том, что замыкание молекулы в цикл приводит к появлению еще одного асимметрического атома углерода. Этот атом углерода получил название аномерного. Таким образом, молекула глюкозы имеет 32 стереоизомера!



Легко запомнить, что циклическая форма монозы, у которой полуацетальный гидроксил расположен по одну сторону с гидроксильной группой, определяющей принадлежность к D- или L-ряду, называется α-формой. Если же эти гидроксильные группы расположены по разную сторону, такая молекула представляет собой β-форму.

Представители моносахаридов

D-рибоза – компонент РНК и коферментов нуклеотидной природы. Ее производное, 2-дезоксирибоза, входит в состав ДНК.

D-глюкоза (виноградный сахар) – кристаллическое белое вещество, хорошо растворимое в воде, температура плавления равна 146°C. Глюкоза примерно в два раза уступает сахарозе по сладости. Полимеры глюкозы, прежде всего целлюлоза и крахмал, составляют значительную часть общей биомассы; в свободном виде D-глюкоза присутствует во фруктовых соках (виноградный сахар), меде, плазме крови человека и животных. В промышленности глюкозу получают из крахмала кипячением с серной кислотой, а также при кислотном гидролизе целлюлозы. Этот процесс называется «осахаривание». Глюкозу, полученную при гидролизе целлюлозы, используют для производства этилового спирта (так называемый гидролизный спирт).

D-галактоза – кристаллическое вещество, составная часть молочного сахара, важнейший компонент пищевого рациона. Достаточно хорошо растворяется в воде, сладкое на вкус, температура плавления равна 165°C. Наряду с D-маннозой, этот моносахарид входит в состав многих гликолипидов и гликопротеинов.

D-манноза – кристаллическое вещество, сладкое на вкус, хорошо растворимое в воде, температура плавления равна 132°C. Встречается в природе в виде полисахаридов – маннанов, из которых может быть получено гидролизом.

D-фруктоза (фруктовый сахар) – кристаллическое вещество, температура плавления равна 132°C. Хорошо растворима в воде, сладкая на вкус, сладость превосходит сладость сахарозы в два раза. Является левовращающим моносахаридом (значение удельного угла вращения в равновесном состоянии равно -92°). В свободной форме содержится во фруктовых соках (фруктовый сахар) и меде. В связанной форме фруктоза присутствует в сахарозе и растительных полисахаридах (например, в инулине).

N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетил-D-галактозамин – ацетилированные аминсахара, входящие в состав гликопротеинов. Характерным компонентом гликопротеинов является N-ацетилнейраминавая (сиаловая) кислота.

Окисление атома углерода карбонильной группы глюкозы до карбоксильной приводит к образованию глюконовой кислоты. Окисление атома углерода на другом конце углеродного скелета (атома C₆ глюкозы), приводит к образованию уроновой кислоты.

Формулы производных глюкозы показаны на [рис. 1.3](#).

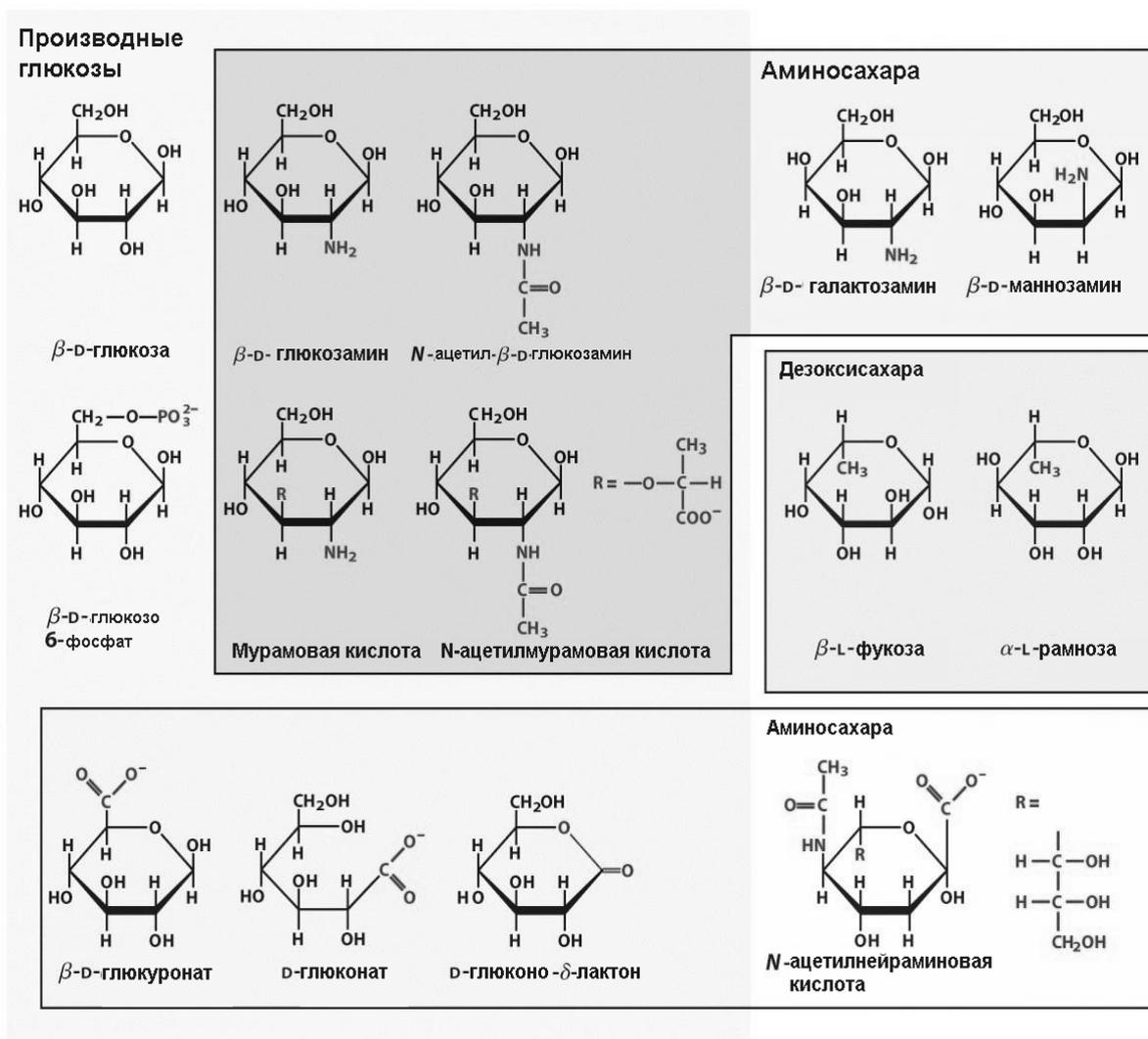
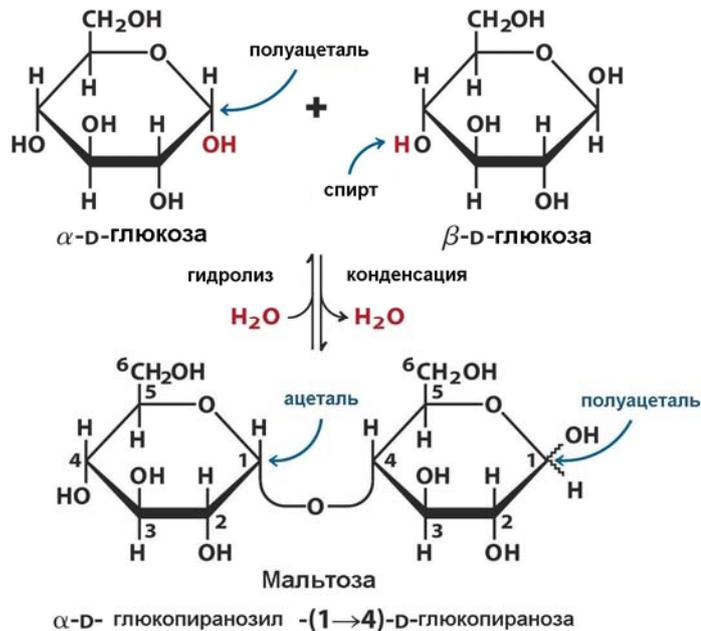


Рис. 1.3. Многообразие производных моносахаридов

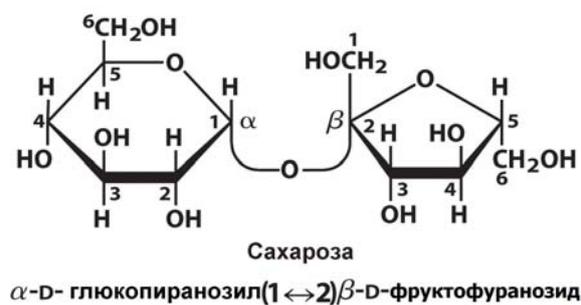
Олигосахариды

Олигосахариды – сложные углеводы, молекулы состоят из небольшого числа (от 2 до 10) остатков моносахаридов. Олигосахариды, состоящие из трех, четырех и пяти остатков моносахаридов, соответственно называют так: три-, тетра-, и пентасахариды. Среди всех олигосахаридов наибольшее значение имеют дисахариды (биозы). Они имеют общую формулу $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Дисахариды содержат два моносахаридных остатка, соединенных О-гликозидной связью, которая формируется тогда, когда гидроксильная группа одной молекулы моносахарида реагирует с гидроксильной группой другой. Связь, образованная между остатками моносахаридов, может быть достаточно легко гидролизована кислотами, но является достаточно устойчивой по отношению к щелочному гидролизу:



Известно, что альдозы, находящиеся в открытой, линейной форме, и обладающие, таким образом, свободной альдегидной группой, отличаются, как и другие альдегиды, восстанавливающими свойствами. Например, они могут давать «реакцию серебряного зеркала». Оказывается, что и некоторые дисахариды также обладают восстанавливающими свойствами. Это такие дисахариды, у которых сохраняется полуацетальный гидроксил одного из остатков моносахаридов. Примером восстанавливающих дисахаридов является мальтоза.

В противоположность ей, в молекуле сахарозы нет свободного гликозидного гидроксила, и поэтому она не обладает восстанавливающими свойствами:



Номенклатура дисахаридов: восстанавливающие дисахариды называются гликозилальдозами или кетозами, а невосстанавливающие – гликозилальдозидами или кетозидами. Краткое написание структуры дисахаридов предусматривает написание моносахаридных остатков подряд, начиная с невосстанавливающего конца, с использованием буквенных обозначений моносахаридных остатков, указанием конформации D и L, цифрами атомы, через которые осуществляется связь, характер кольца – пираноза или фураноза, стрелкой – направление связи.

Например, сахароза: α -D-Glcp (1→2)- β -D-Fruf; мальтоза: α -D-Glcp (1→4) α -D-Glcp; лактоза: β -D-Galp (1→4) α -D-Glcp; изомальтоза: α -D-Glcp (1→6) α -D-Glcp. В повседневной практике чаще употребляются рабочие, тривиальные названия, многие из которых указывают или на происхождение данного дисахарида, или на его свойства. Тривиальные названия формируются с добавлением окончания – оза.

Рациональные названия дисахаридов: сахароза – α -D-глюкопиранозил (1→2)- β -D-фруктофуранозид; лактоза □ β -D-галактопиранозил (1→4)- α -D-глюкопираноза.

Отдельные представители дисахаридов

Мальтоза, или солодовый сахар (от лат. maltum – солод), является продуктом неполного гидролиза крахмала. Образуется под влиянием ферментов, содержащихся в солоде.

Изомальтоза – входит в состав амилопектиновой фракции крахмала и гликогена, связь α (1→6).

Целлобиоза – повторяющееся звено целлюлозы, связь β (1→4); широко распространена в растительном мире.

Лактоза (молочный сахар) в значительных количествах находится в молоке, имеет важное значение для растущих организмов, как животных, так и человека. В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке – до 7,5%. При гидролизе, например в кишечнике во время переваривания пищи, лактоза распадается на α -D-глюкозу и β -D-галактозу.

Сахароза (тростниковый сахар) служит растворимым резервным сахаридом растений. В больших количествах содержится в сахарной свекле, сахарном тростнике и кленовом соке, из которых ее получают в промышленных масштабах. Сахароза является наиболее известным дисахаридом, т.к. чрезвычайно широко используется в пищевой промышленности и в домашнем питании.

Гидролиз сахарозы ($[\alpha]_D^{20} = +66,5^\circ$) с образованием глюкозы ($[\alpha]_D^{20} = +52,5^\circ$) и фруктозы ($[\alpha]_D^{20} = \square 92^\circ$) часто называют инверсией, поскольку он сопровождается изменением знака оптического вращения, правовращающая сахароза превращается в левовращающую смесь эквимольных количеств глюкозы и фруктозы. Эту смесь часто называют инвертным сахаром.

Трегалоза – грибной сахар, состоит из двух остатков α D-Glc, соединенных α (1→1)-гликозидной связью. Встречается в грибах, спорынье, водорослях и некоторых других растениях. Является главным углеводом гемолимфы многих насекомых.

Лекция 2

Строение, свойства, биологическая роль гомо – и гетерополисахаридов

Полисахариды – это природные высокомолекулярные вещества, состоящие из большого количества остатков моносахаридов (рис.2.1). Полисахариды, в составе которых присутствуют остатки только одного моносахарида, называют гомополисахаридами. Если остатки моносахаридов разные, такие полисахариды называют гетерополисахаридами.

Полисахариды в различных организмах выполняют несколько важных биологических функций:

- 1) структурная у растений (целлюлоза);
- 2) защитная у членистоногих (хитин);
- 3) запасаящая (крахмал – у растений; гликоген – у животных и грибов).

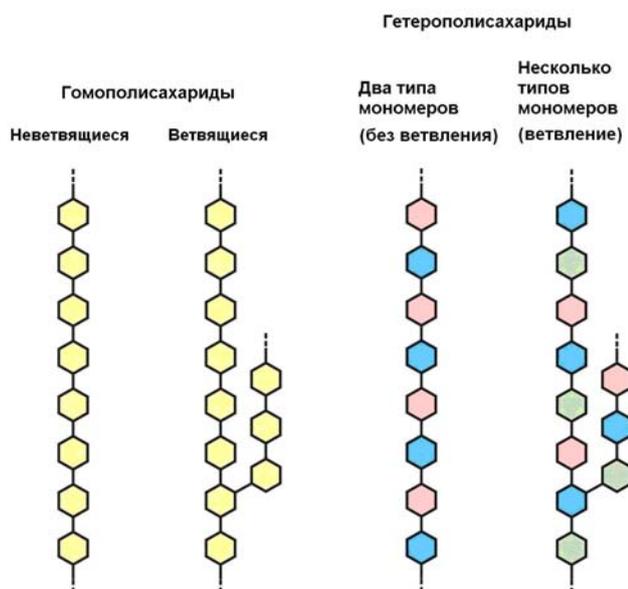
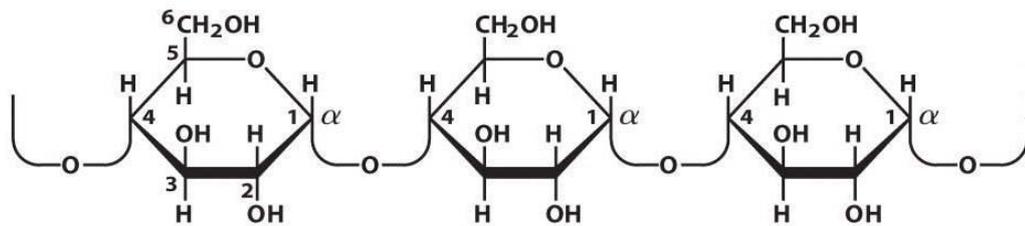


Рис. 2.1. Структура гомо- и гетерополисахаридов

Поскольку наиболее распространенными представителями полисахаридов являются крахмал, гликоген и целлюлоза, рассмотрим строение этих веществ подробнее.

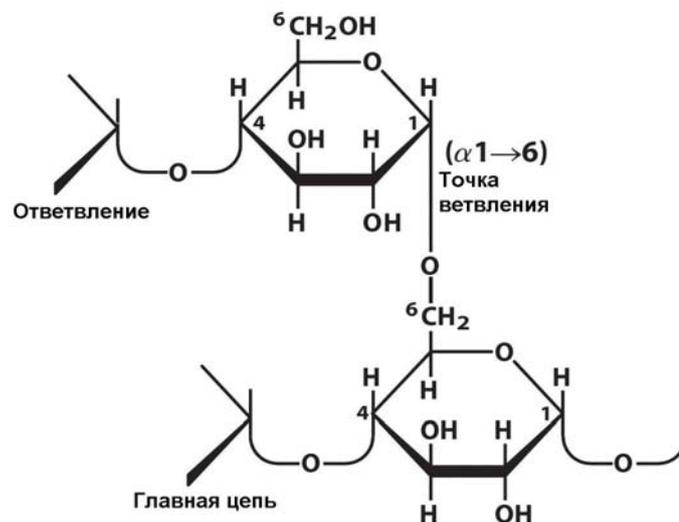
Крахмал, широко распространенный резервный полисахарид растений, является наиболее важным углеводным компонентом пищевого рациона. Он содержится в хлоропластах листьев, плодах, семенах и клубнях. Особенно высоко содержание крахмала в зерновых культурах (до 75% от сухой массы), клубнях картофеля (примерно 65%) и других запасяющих частях растений. Крахмал откладывается в форме микроскопических гранул в специальных органеллах – амилопластах. При продолжительном кипячении примерно 15-25% крахмала переходит в раствор в виде коллоида. Этот «растворимый

крахмал» носит название «амилоза». Остальная часть, амилопектин, не растворяется даже при очень длительном кипячении. И крахмал, и амилоза построены из остатков α -D-глюкозы, связанных α -(1,4')-глюкозидными связями. Цепочки молекул крахмала имеют большую молекулярную массу. Молекулярная масса амилозы достигает 160000, а молекулярная масса амилопектина может составлять более 1000000.



Амилоза

Молекулы амилозы имеют вид нитей, а молекулы амилопектина имеют боковые ответвления, расположенные через 24 – 30 глюкозных остатков. Эти ответвления образуются по типу (1 – 6) глюкозидных связей:



Пространственные взаимоотношения между амилозой и амилопектином в растительных гранулах крахмала можно представить следующим образом, см. [рис. 2.2](#).

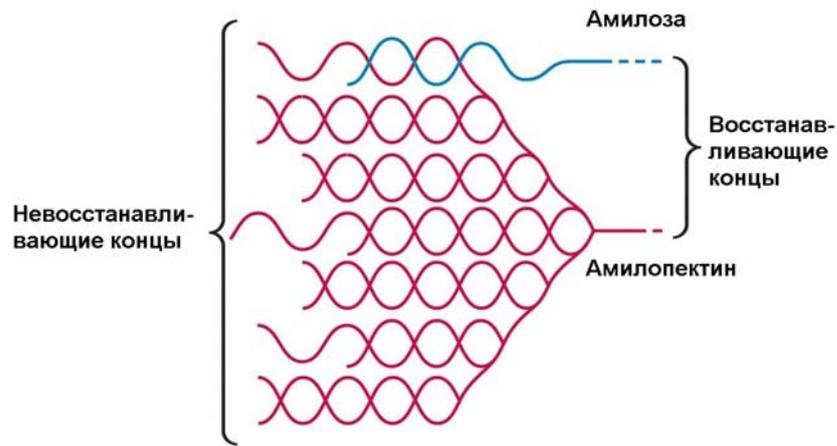


Рис. 2.2. Пространственные взаимоотношения между амилозой и амилопектином в растительных гранулах крахмала

Гликоген – запасующий полисахарид животных и человека. Цепочки гликогена, как и крахмала, построены из остатков α -D-глюкозы, связанных α -(1,4)-глюкозидными связями. Но ветвление гликогена более частое, в среднем приходится на каждые 8 – 12 остатков глюкозы. Вследствие этого гликоген представляет собой более компактную массу, чем крахмал. Особенно много гликогена содержится в печени, где его количество может достигать 7% от массы всего органа. В гепатоцитах гликоген находится в гранулах большого размера, которые представляют собой кластеры, состоящие из более мелких гранул, являющихся единичными молекулами гликогена и имеющих среднюю молекулярную массу несколько миллионов. Эти гранулы содержат также ферменты, способные катализировать реакции синтеза и реакции распада гликогена.

Поскольку каждое ответвление гликогена оканчивается невосстанавливающим остатком глюкозы, молекула гликогена имеет столько же невосстанавливающих концов, сколько ответвлений, и только один восстанавливающий конец. Ферменты деградации гликогена воздействуют только на невосстанавливающие концы и могут одновременно функционировать на многих ветвях молекулы. Это значительно увеличивает суммарную скорость распада молекулы гликогена на моносахариды.

Для чего необходимо сохранять глюкозу в форме полисахарида? Рассчитано, что гепатоциты содержат столько гликогена, что если бы содержащаяся в нем глюкоза находилась в свободной форме, ее концентрация в клетке составила бы 0,4 М. Это бы обусловило очень высокое осмотическое давление среды, при котором клетка не смогла бы существовать. Концентрация глюкозы в крови обычно составляет 5 мМ. Таким образом, между кровью и цитоплазмой гепатоцита возник бы очень большой градиент концентрации глюкозы, вода из крови стала бы входить внутрь клетки, что привело бы к ее раздутию и разрыву плазматической мембраны. Таким образом, синтез гликогена позволяет не допустить чрезмерного изменения осмотических свойств клетки при хранении значительных количеств глюкозы.

Целлюлоза состоит из остатков глюкозы, связанных, в отличие от крахмала и гликогена, в положении $\beta(1\rightarrow4)$. Она является самым распространенным органическим соединением в живой природе. Молекулярная масса целлюлозы может составлять 1000000 и более. Природная целлюлоза обладает высокой механической прочностью, устойчива к химическому и ферментативному гидролизу. Эти свойства связаны с конформацией молекул и особенностями надмолекулярной организации. Неразветвленные связи типа $\beta(1\rightarrow4)$ приводят к образованию линейных цепей, которые стабилизированы внутри- и межцепочечными водородными мостиками, образованными гидроксильными группами, см. [рис.2.3](#).

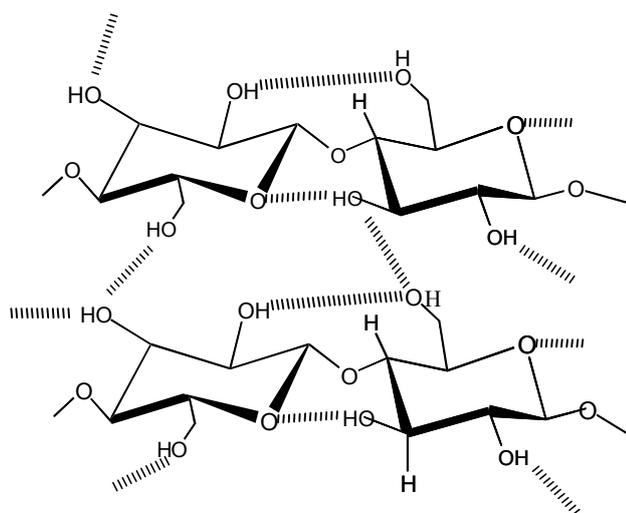


Рис. 2.3. Образование водородных связей в молекуле целлюлозы

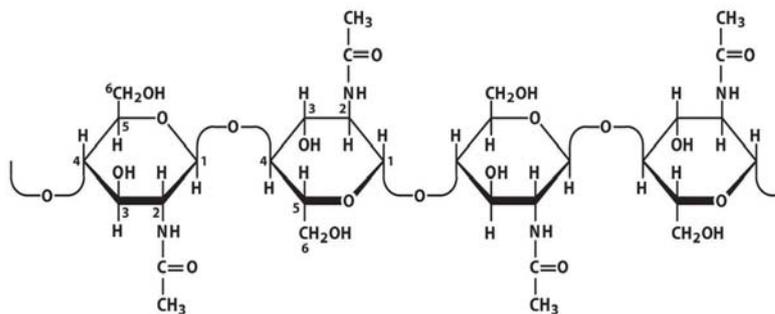
Отдельные представители полисахаридов

Муреин входит в состав клеточных стенок бактерий в качестве структурного полисахарида. В нем чередуются остатки двух различных моносахаридов, связанных в положении $\beta(1\rightarrow4)$: N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты.

Декстраны – это полисахариды бактерий и дрожжей, представляющие собой полимеры глюкозы, связанной преимущественно в положении $\alpha(1\rightarrow6)$, а также в точках ветвления в положении $\alpha(1\rightarrow3)$ и иногда в положениях $\alpha(1\rightarrow2)$ или $\alpha(1\rightarrow4)$. В воде декстран образует гели. Синтетические декстраны используются в ряде коммерческих продуктов (например, Sephadex), которые применяются в хроматографии для разделения макромолекул. В таких продуктах декстраны химически модифицированы путем введения поперечных сшивок, делающих их непроницаемыми для молекул определенных размеров. Растворимый декстран применяется при создании заменителей плазмы крови, а также используется как пищевой продукт.

Хитин, гомополимер из N-ацетилглюкозамина, связанного в положении $\beta(1\rightarrow4)$, является основным компонентом наружного скелета насекомых

и панциря ракообразных. Кроме того, он входит в состав клеточных стенок мицелия грибов:



Хитин

Полисахариды из водорослей например, агароза, применяются как желеобразующие вещества. Агарозы более 100 лет используются в микробиологии как гелевая основа питательных сред (агар-агар).

Для того чтобы запись структуры олиго- и полисахаридов не занимала слишком много места, при отображении остатков моносахаридов используют латинскую трехбуквенную символику. Обозначения, принятые для важнейших моносахаридов и их производных представлены в [табл. 2.1](#).

Таблица 2.1

Сокращенная форма записи наиболее распространенных моносахаридов и их производных

Название моносахарида	Трехбуквенная символика	Название производных моносахаридов	Трехбуквенная символика
Арабиноза	Ara	Глюкуроновая кислота	GlcA
Фруктоза	Fru	Галактозамин	GalN
Фукоза	Fuc	Глюкозамин	GlcN
Галактоза	Gal	N-ацетилгалактозамин	GalNAc
Глюкоза	Glc	N-ацетилглюкозамин	GlcNAc
Манноза	Man	Идуоновая кислота	IdoA
Рамноза	Rha	Мурамовая кислота	Mur
Рибоза	Rib	N-ацетилмурамовая кислота	Mur2Ac
Ксилоза	Xyl	N-ацетилнейраминовая кислота	Neu5Ac

Таким образом, молекулу целлюлозы можно записать как $[\beta\text{Glc}(1\rightarrow4)]_n$, а молекулу хитина как $[\text{---}\beta\text{GlcNAc}(1\rightarrow4)\text{---}]_n$.

Лекция 3

Строение, свойства, биологическая роль простых липидов

Липиды – это группа разнородных по химическому строению органических веществ, общим свойством которых является их нерастворимость в воде.

Функции липидов в организме:

энергетическая: запасание и хранение энергии (нейтральные жиры). При расщеплении 1 г нейтрального жира выделяется около 9 ккал или 38 кДж, что более чем в 2 раза превышает выход энергии при расщеплении 1 г углеводов или белков;

защитная (липидный слой кожи животных защищает их от механических и температурных воздействий);

структурная (многие липиды являются структурными компонентами клеточных мембран);

регуляторная (некоторые гормоны имеют липидную природу, например, половые).

Классификация

Липиды бывают простые и сложные. Простые состоят из двух компонентов (например, нейтральные жиры содержат глицерин и жирные кислоты), а сложные – более чем из двух.

К простым липидам относятся жиры (триглицеролы или нейтральные жиры) и воски. Их обязательный компонент – жирные кислоты.

Жирные кислоты (ЖК) – это монокарбоновые кислоты с одной алифатической цепью, т.е. состоящие из одной карбоксильной группы и длинного неполярного хвоста.

Жирные кислоты природных липидов, как правило, содержат четное количество атомов углерода

Жирные кислоты подразделяются на предельные (или насыщенные) и непредельные (ненасыщенные). Предельные кислоты не содержат двойных связей. Непредельные кислоты содержат одну (мононенасыщенные) или несколько (полиненасыщенные) двойных связей:



Двойные связи в природных полиненасыщенных жирных кислотах – изолированные (несопряженные). Как правило, связи имеют цис-

конфигурацию, что придает таким молекулам дополнительную жесткость. Это имеет биологический смысл, т.к. такие молекулы входят в состав клеточных мембран.

Приведем их классификацию.

Из ненасыщенных ЖК чаще всего встречаются пальмитиновая и стеариновая.

$C_{16:0}$ – сокращенное обозначение пальмитиновой кислоты – означает, что у нее 16 атомов углерода и нет двойных связей.

$CH_3(CH_2)_{14}COOH$ – другое обозначение пальмитиновой кислоты

$C_{18:0}$ – стеариновая, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$

Кроме того, выделяются следующие насыщенные жирные кислоты:

$C_{12:0}$ – лауриновая;

$C_{14:0}$ – миристиновая;

$C_{20:0}$ – арахидиновая;

$C_{22:0}$ – бегеновая;

$C_{24:0}$ – лигноцеридиновая.

Моноеновые:

$C_{16:1}$ – пальмитоолеиновая

$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$;

$C_{18:1}$ – олеиновая

$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$.

Положение двойной связи относительно карбоксильной группы обозначают знаком Δ^9 , где число показывает порядковый номер атома углерода, возле которого находится двойная связь. Таким образом, названные кислоты могут быть обозначены соответственно $C_{16:1}, \Delta^9$ и $C_{18:1}, \Delta^9$.

Полиеновые кислоты чаще всего бывают с двумя и тремя двойными связями:

$C_{18:2}, \Delta^9$ – линолевая, $CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$;

$C_{18:3}, \Delta^9$ – линоленовая, $CH_3CH_2(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$.

Иногда встречаются жирные кислоты (т.н. необычные), в алифатических цепях которых есть заместители: CH_3 -, $-OH$, $C=O$ и др.:

$CH_3(CH_2)_7-\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{CH}-(CH_2)_8COOH$ – туберкулостеариновая, $C_{19:0}$, из туберкулезных палочек

$CH_3(CH_2)_5-\overset{\text{C H}_2}{\text{C}}-\text{CH}-(CH_2)_9COOH$ – лактобациллозная $C_{19:0}$.

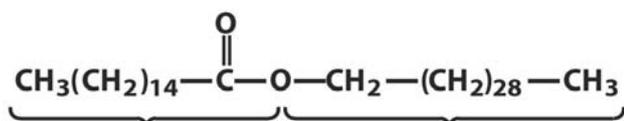
Жирные кислоты нерастворимы в воде, температура плавления понижается с увеличением числа двойных связей и укорочением цепи.

Такие жирные кислоты, как линолевая, линоленовая и им подобные (с двумя и тремя двойными связями), не синтезируются внутри организма человека и называются незаменимыми. Поэтому их необходимо получать с пищей.

При этом полиеновые кислоты делят на две группы: ω -3 и ω -6 (в зависимости от положения двойной связи от углеродного атома последней, метильной группы). Эти кислоты являются предшественниками разных групп гормонов местного действия – эйкозаноидов. Так, линолевая кислота является примером ω -6 кислот. В качестве примера ω -3 кислот можно привести тимнодоновую (эйкозапентановую) кислоту, $C_{20:5}$ (ω -3). Она содержится в жире морских рыб, хотя имеет растительное происхождение, синтезируется фитопланктоном. Кроме того, такие рыбы как лосось, макрель, сельдь, сардина и др., поедая планктон, накапливают эту кислоту в своем жире. При употреблении человеком в пищу этой кислоты у него понижается свертываемость крови, что используется для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Воски

Воски – это сложные эфиры, образуемые длинноцепочечными жирными кислотами и длинноцепочечными спиртами (с числом углеродных атомов от 16 до 36). Воски широко распространены в природе. Восковое покрытие листьев и плодов растений защищает их от механических повреждений, уменьшает потери влаги, препятствует возникновению инфекции. У позвоночных воски, секретлируемые кожными железами, выполняют функцию защитного покрытия, смазывающего и смягчающего кожу и предохраняющего ее от воды. Восковым секретом покрыты волосы. Перья птиц и шкура животных также имеют восковое покрытие, придающее им водоотталкивающие свойства. Воск овечьей шерсти – ланолин – широко используется в медицине и косметике как основа для приготовления мазей и кремов. Воск, вырабатываемый пчелами, служит строительным материалом сот:



Пчелиный воск

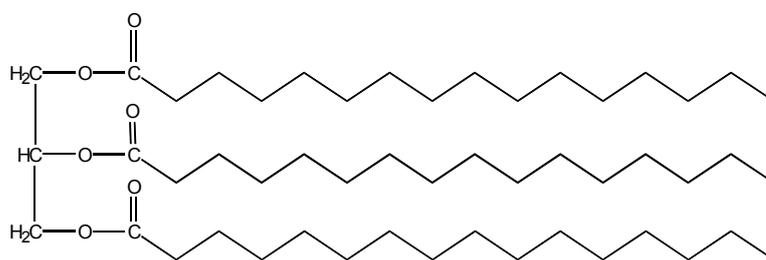
Воски являются нормальными метаболитами некоторых микроорганизмов. Природные воски наряду со сложными эфирами высших жирных ки-

слот и высших спиртов содержат некоторое количество свободных жирных кислот, спиртов, а также углеводов с нечетным числом атомов углерода (21-35), красящих и душистых веществ. Все воски представляют собой твердые вещества разнообразной окраски, устойчивые к действию света, окислителей, нагреванию. Температура их плавления – от 30 до 90° С.

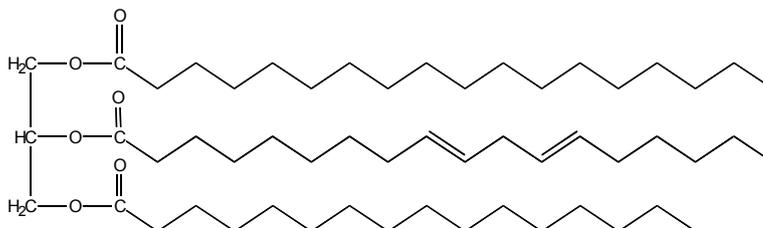
Нейтральные жиры (триацилглицеролы, триглицериды)

Это сложные эфиры глицерина и жирных кислот. Нейтральные жиры бывают простыми и смешанными. Простые содержат одинаковые остатки жирных кислот, смешанные – остатки разных жирных кислот. В состав нейтральных жиров могут входить как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты.

Нейтральные жиры делятся на триацилглицериды, диацилглицериды и моноацилглицериды (в зависимости от количества жирных кислот, присоединенных к глицерину). Наиболее распространены триацилглицериды. Названия триацилглицеролов образуются от названий жирных кислот, входящих в их состав. Например, триацилглицерол, содержащий три остатка пальмитиновой кислоты, будет называться трипальмитин:



Если молекула содержит остатки различных жирных кислот, то в названии будут указаны все входящие в ее состав остатки с окончанием –оил и добавлением слова глицерол. Например, 1-стеароил, 2-линолеоил, 3-пальмитоил глицерол:



Физико-химические свойства триглицеридов определяются свойствами входящих в их состав жирных кислот. Как правило, животные триацилглицериды содержат больше насыщенных кислот, чем растительные, и поэтому

тверже. Состав и качество жира характеризуются особыми параметрами, называемыми химическими константами триглицеридов:

1) йодное число – это количество граммов йода, которое связывается 100 граммами жира. Поскольку йод связывается только с двойными связями жирных кислот, йодное число характеризует степень ненасыщенности жира.

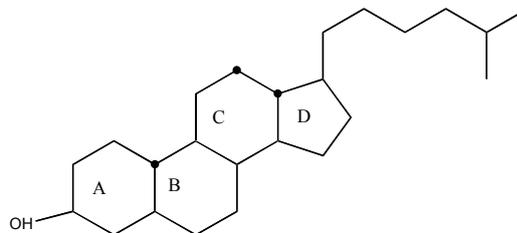
2) кислотное число – количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации 1 грамма жира. Указывает на количество свободных жирных кислот в жире.

3) число омыления □ количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, свободных и связанных, входящих в состав жира.

Стероиды

Стероиды – это группа соединений, имеющих в своей структуре ядро, образованное гидрированным фенантроном (кольца А, В, С) и циклопентаном (кольцо D). Каждое из 6-углеродных колец может находиться в форме «кресла» или «ванны», что является более устойчивой конформацией. В свою очередь, по отношению друг к другу кольца могут находиться в *цис*- или *транс*-положениях.

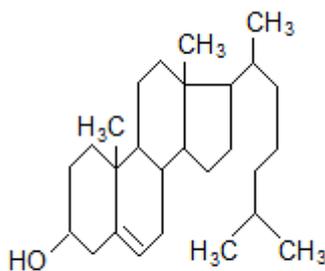
Среди стероидов выделяется группа соединений, получивших название стеринов (стеролов). Характерным для них является наличие гидроксильной группы в положении 3, а также боковой цепи в положении 17:



Стерины подразделяют на зоо-, фито- и микостерины (содержатся в грибах).

У важнейшего представителя стеринов – холестерина – все кольца находятся в *транс*-положении и, кроме того, он имеет двойную связь между 5-м и 6-м углеродными атомами.

Холестерин, следовательно, является ненасыщенным спиртом. Боковые поверхности стероидного ядра были бы почти плоскими, если бы не метильные группы, присоединенные к C₁₀ и C₁₃, что делает одну из сторон молекулы более выпуклой. Эта сторона обозначается как β, а противоположная ей как α. Прородный холестерин содержит гидроксильную группу на β-поверхности. Его изомер с гидроксильной группой на α-поверхности называется эпихолестерин.



Холестерин

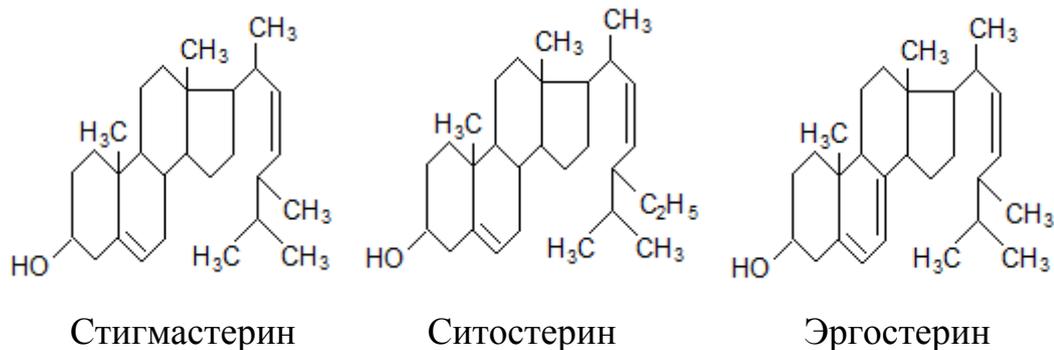
Кольцевая структура холестерина отличается значительной жесткостью, а боковая цепь, напротив, относительно подвижна. В чистом виде холестерин представляет собой кристаллические жемчужные пластинки или иглы, воскообразные на ощупь и не растворимые в воде, но растворимые в органических соединениях. Наличие у холестерина в 3-м положении гидроксильной группы обуславливает ряд физико-химических свойств. Благодаря этой группе холестерин образует эфиры с жирными кислотами. Эфиры холестерина, так же как и сами жирные кислоты, в зависимости от температуры и других условий, могут находиться в состоянии жидких кристаллов, в том числе и в организме животных и человека.

Холестерин является одним из важнейших веществ организма. Каждая клетка содержит его. Неэстерифицированный холестерин вместе с фосфолипидами и белками обеспечивает избирательную проницаемость клеточной мембраны и влияет на состояние мембраны и на активность связанных с ней ферментов. В цитоплазме клеток холестерин находится преимущественно в виде эфиров с жирными кислотами, образуя мелкие капли.

В теле взрослого человека общее содержание холестерина оценивается величиной порядка 200-350 граммов. В крови большая часть холестерина связана с белками. Норма содержания общего холестерина 1,5 – 2,5 г/л. У взрослого человека примерно 67-70 % холестерина плазмы крови находится в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), 9-10 % в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и 20-24 % в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). У животных, не склонных к возникновению атеросклероза большая часть холестерина находится в плазме виде ЛПВП, обладающих антиатерогенным действием.

Гипохолестеринемия может быть связана с пониженным поступлением холестерина с пищей или снижением биосинтеза эндогенного холестерина, что в свою очередь может быть связано либо с недостатком питания, либо с блокадой биосинтеза холестерина в печени. Гиперхолестеринемия может быть обусловлена повышением скорости биосинтеза холестерина или повышением его поступлением с пищей. Также гиперхолестеринемия может быть вызвана наследственным недостатком рецепторов к ЛПНП, вследствие чего резко снижается захват и последующий катаболизм холестерина. Гиперхолестеринемия лежит в основе развития атеросклероза.

В мембранах растительных клеток содержатся близкие к холестерину соединения, называемые фитостеринами. Они отличаются от холестерина строением только боковой цепи. В дрожжевых клетках находится эргостерин, который отличается строением боковой цепи и тем, что содержит двойную связь между 7-м и 8-м атомами углерода в кольце. Клетки бактерий стеринов не содержат.

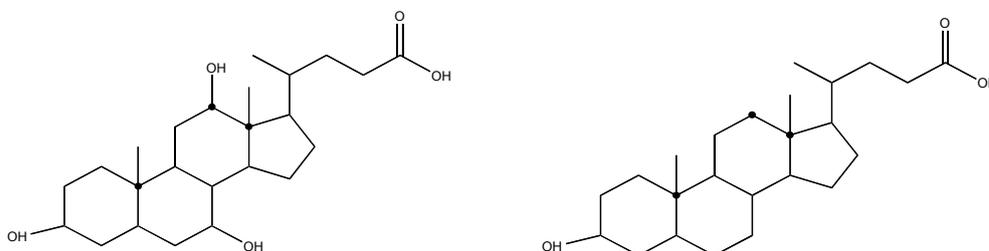


Восстановленное производное холестерина – копростерин, содержится в составе фекалий человека и млекопитающих.

Желчные кислоты

Из холестерина в печени образуются желчные кислоты. По химическому строению эти соединения близки к холестерину. Для них характерно наличие укороченной разветвленной боковой цепи с карбоксильной группой на конце. Двойная связь в кольце В отсутствует, а кольца А и В сочленены в цис-положении. Стероидный кор в положениях 3, 7 и 12 содержит от одной до трех β-гидроксильных групп.

Желчные кислоты обеспечивают растворимость холестерина в желчи и способствуют перевариванию липидов. В печени вначале образуются первичные желчные кислоты – холевая и хенодезоксихолевая (антроподезоксихолевая).

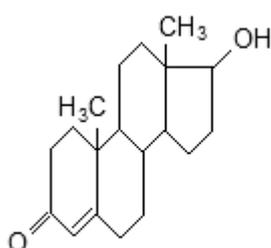


Холевая кислота

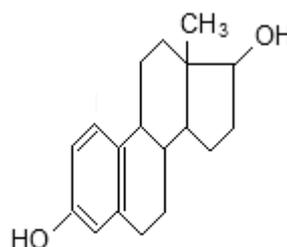
Литохолевая кислота

Дегидроксилирование этих соединений по С-7 микрофлорой кишечника приводит к образованию вторичных желчных кислот – литохолевой и дезоксихолевой.

В организме человека присутствуют шесть стероидных гормонов: прогестерон, кортизол, альдостерон, тестостерон, эстрадиол и кальцитриол (устаревшее название – кальциферол).



Тестостерон



Эстрадиол

За исключением кальцитриола, эти соединения имеют очень короткую боковую цепь из двух углеродных атомов или не имеют ее вовсе. Для большинства соединений этой группы характерно наличие оксогруппы при C-3 и сопряженной двойной связи C-4/C-5 в кольце А. Различия наблюдаются в строении колец С и D. В эстрадиоле кольцо А ароматическое и, следовательно, гидроксильная группа обладает свойствами фенольной ОН-группы. Кальцитриол отличается от гормонов позвоночных, однако также построен на основе холестерина. За счет светозависимой реакции раскрытия кольца В кальцитриол образует так называемый секостероид – стероид с раскрытым кольцом.

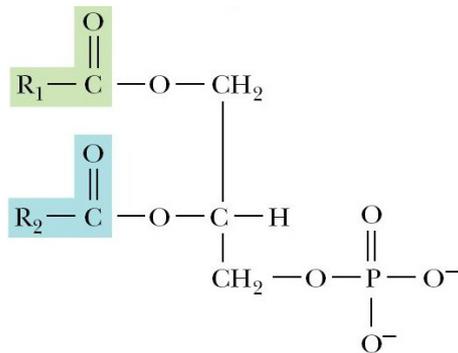
Экдизон – стероидный гормон насекомых – представляет собой более раннюю в эволюционном отношении форму стероидов. Стероидные гормоны, выполняющие сигнальную функцию, встречаются также в растениях.

Лекция 4

Строение, свойства, биологическая роль сложных липидов

Глицерофосфолипиды в качестве структурной основы содержат трехатомный спирт глицерол. При гидролизе глицерофосфолипидов кроме глицерола обнаруживают две жирные кислоты, фосфорную кислоту и различные заместители. Жирные кислоты присоединяются к первому и второму атомам глицерола сложно-эфирной связью; при этом, как правило, природные глицерофосфолипиды содержат насыщенную жирную кислоту в первом положении, а ненасыщенную (моноеновую или полиеновую) – во втором. В третьей позиции находится остаток фосфорной кислоты, к которой присоединяются различные заместители. Если в третьем положении имеется только фосфорная кислота, глицерофосфолипид называется фосфатидной кислотой. Фосфатидная кислота образуется в организме в процессе биосинтеза триацилглицеролов и глицерофосфолипидов как общий промежуточный метаболит. Остаток фосфатидной кислоты называют фосфатидил; он входит в на-

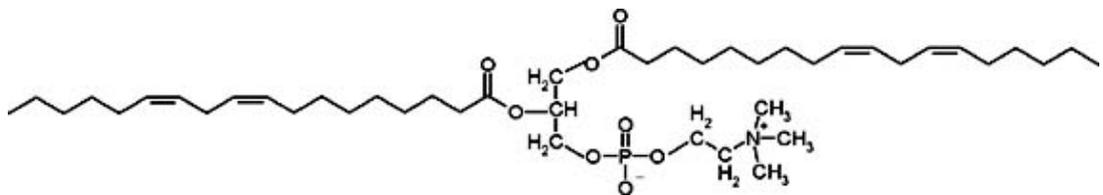
звание других глицерофосфолипидов, после которого указывают название заместителя атома водорода в фосфорной кислоте.



Фосфатидная кислота

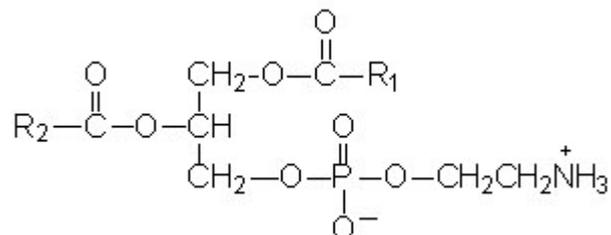
В качестве заместителя в природных глицерофосфолипидах находится либо аминоспирт холин, либо азотистое основание этаноламин, либо остаток аминокислоты серина, либо шестиатомный спирт инозитол, либо вторая молекула глицерола. В полном названии глицерофосфолипида будет учитываться название заместителя, которое присоединяется к слову «фосфатидил».

Фосфатидилхолин (лецитин) в своем составе содержит аминоспирт холин. Фосфатидилхолины широко распространены в клетках; особенно их много в мозговой ткани человека и животных, в растениях они встречаются в соевых бобах, зародышах пшеницы, семенах подсолнечника. В бактериальных клетках их содержание невелико.



Фосфатидилхолин

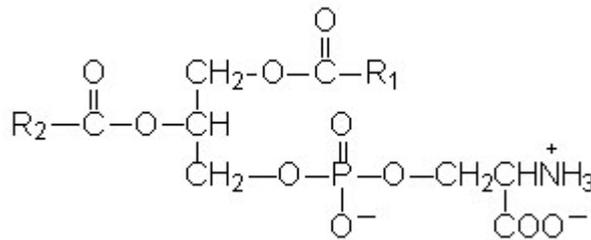
Фосфатидилэтанолламин (кефалин) содержит этаноламин, который присоединяется к остатку фосфорной кислоты эфирной связью:



Фосфатидилэтанолламин

Фосфатидилэтаноламины (так же как и фосфатидилхолины) являются главными липидными компонентами, формирующими билипидный матрикс биологических мембран. При этом, как правило, фосфатидилхолины почти полностью располагаются во внешнем монослое билипидного матрикса, а фосфатидилэтаноламин – во внутреннем.

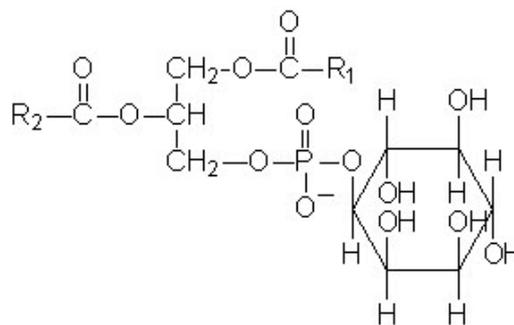
Фосфатидилсерин содержит полярную группу в виде остатка аминокислоты серина:



Фосфатидилсерин

Значение фосфатидилсерина определяется тем, что он является предшественником синтеза фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов и в значительно меньших количествах входит в состав биологических мембран.

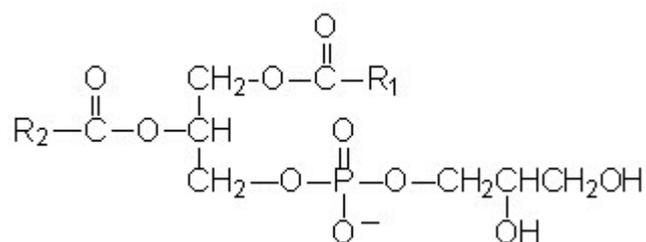
Фосфатидилинозитолы отличаются от других групп глицерофосфолипидов тем, что в их состав вместо азотсодержащих веществ входит шестиатомный циклический спирт инозитол. Они присутствуют в клеточных мембранах животных, высших растений, микроорганизмов; особенно высоко их содержание в миелиновых оболочках нервных волокон.



Фосфатидилинозитол

Важную биологическую роль фосфатидилинозитолы выполняют в виде фосфорилированных производных, например таких, как инозитол-4,5-дифосфат, моноинозитол-1,4,5-трифосфат, участвуя как вторичные мессенжеры (посредники) в реализации Ca^{2+} -зависимых действий ряда гормонов.

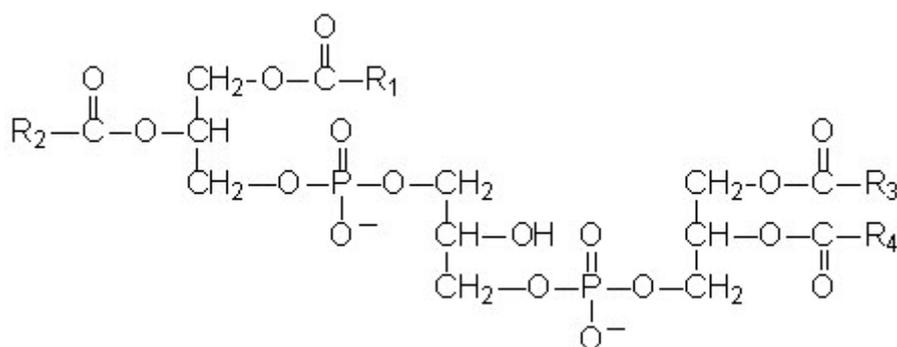
Фосфатидилглицеролы в качестве заместителя содержат ещё одну молекулу глицерола, которая, как и другие заместители, присоединяется к фосфатиду эфирной связью:



Фосфатидилглицерол

Фосфатидилглицеролы в значительных количествах обнаруживаются в бактериальных мембранах, а также в хлоропластах растений.

Кардиолипины можно рассматривать как производное фосфатидилглицеролов, у которых 3-гидроксигруппа второго остатка молекулы глицерола этерифицирована молекулой фосфатидной кислоты.



Кардиолипин (дифосфатидилглицерол)

Своим названием кардиолипин обязан сердечной мышце, из которой он был выделен впервые. Его содержание в плазматических мембранах клеток невелико, и в этом смысле кардиолипин относится к минорной фракции глицерофосфолипидов. Однако маркерным липидом он является для таких внутриклеточных органоидов, как митохондрии, в которых ему отведена исключительная роль в структурной организации и функционировании дыхательной цепи.

Плазмалогены – глицерофосфолипиды, у которых вместо остатка жирной кислоты при первом атоме углерода трехатомного спирта глицерола находится α- или β-ненасыщенный спирт, образующий простую эфирную связь с гидроксильной группой глицерола. При гидролизе этой эфирной связи образуется альдегид соответствующего спирта – фосфатидаль.

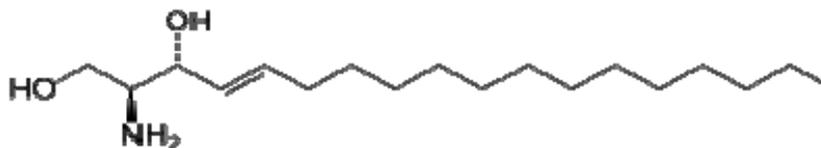
Плазмалогены бывают трех видов: фосфатидальэтанолламины, фосфатидальхолины и фосфатидальсерины. На долю плазмалогенов приходится около 10% фосфолипидов мозга и мышечной ткани. В тканях некоторых беспозвоночных их доля доходит до 25%, они обнаружены в эритроцитах, бактериальных мембранах и практически отсутствуют в растениях.

Общим свойством глицерофосфолипидов, объясняющим их важную роль в формировании билипидного матрикса как основы биологических мембран, играет амфипатичность их молекул, или, другими словами, наличие в их структуре гидрофобной и гидрофильной частей. Гидрофобная состав-

ляющая представлена алифатическими радикалами жирных кислот, которые ориентированы внутрь билипидного матрикса, формируя гидрофобную полость. Гидрофильная составляющая представлена остатком фосфорной кислоты и различными полярными группами, которые ориентированы в водную фазу. Наличие асимметрического атома углерода в молекуле создает условия для существования изомеров. Все природные глицерофосфолипиды относятся к L-ряду.

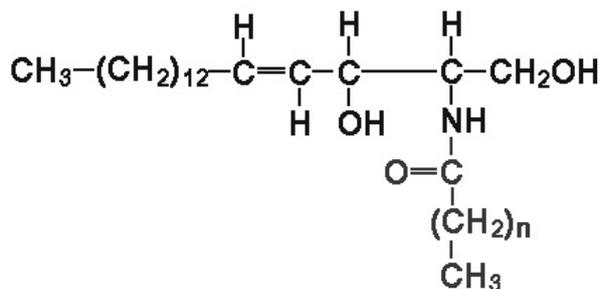
Глицерофосфолипиды существуют не только в диацильной форме. Под действием фосфолипазы A₂ они теряют остаток жирной кислоты у второго атома углерода глицерола с образованием лизофосфолипида, при этом меняются их свойства. Так, например, накопление лизофосфатидилхолина в мембране эритроцитов вызывает их разрушение, поскольку лизофосфатидилхолин приобретает свойства детергента.

Сфинголипиды являются производными 18-атомного, ненасыщенного дигидроксиаминоспирта – сфингозина или его насыщенного аналога – дигидросфингозина.



Сфингозин

Сфингозин ацетируется различными ЖК, образуя семейство молекул, называемых церамидами. Они отличаются радикалами жирных кислот. Обычно это жирные кислоты от 18 до 26 атомов углерода. Жирная кислота связана со сфингозином через аминогруппу с образованием амидной связи.



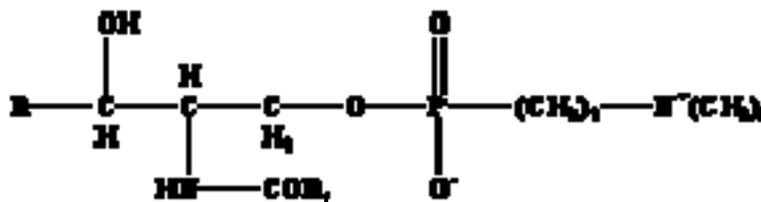
Церамид

Гидроксильные группы сфингозина способны взаимодействовать с другими радикалами.

Сфинголипидом, наиболее распространенным в природе, является сфингомиелин, фосфохолиновое производное церамида. Сфингомиелины имеют амфипатические свойства, сформированные, с одной стороны, радикалом жирной кислоты и алифатической частью самого сфингозина, а с другой – полярной областью фосфохолина. Сфингомиелины находятся в мем-

бранах животных и растительных клеток. Особенно ими богата нервная ткань; кроме того их можно выделить из ткани почек, печени, крови.

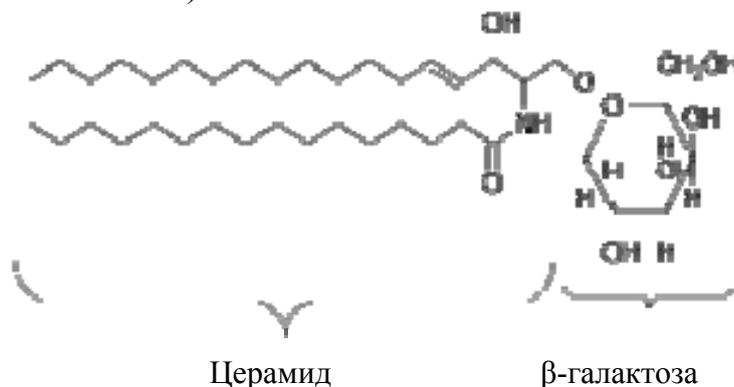
Сфингомиелины содержат преимущественно насыщенные и моноеновые жирные кислоты, имеющие 18-24 атомов углерода. В состав жирных кислот входит значительное количество лигноцериновой и нервоновой кислот.



Сфингомиелин

Гликолипиды – ещё одна большая и разнообразная группа сложных липидов, основу которых составляют церамиды, где водород их гидроксильной группы замещен на разные углеводные фрагменты. Если углевод представлен моносахаридом (чаще галактозой), образуется моногексозилцерамида, часто называемые цереброзидами. Цереброзиды содержатся в тканях животных, растений и микроорганизмах.

Галактозилцерамида является основными гликолипидами мозговой и нервной тканей, содержат различные жирные кислоты, в том числе цереброновую ($C_{24:1}$, гидроксикислота).



Церамид

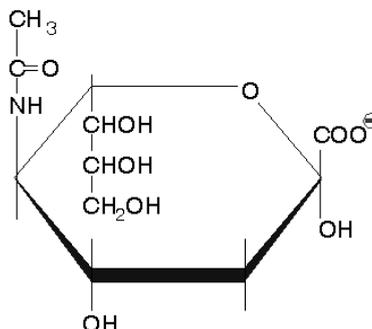
β-галактоза

Галактоцереброзид

Гидроксил у третьего углеродного атома моносахарида может взаимодействовать с серной кислотой, или, другими словами, сульфатироваться. В этом случае образуется сульфатид, обладающий свойствами кислот и поэтому называется кислым сфинголипидом. При физиологическом значении pH сульфатиды имеют отрицательный заряд. Почти 25% цереброзидов мозга находятся в сульфатированном состоянии. В других тканях содержатся, главным образом, глюкозилцерамида.

Наиболее сложные по составу липиды – это ганглиозиды, к которым относятся более 60 видов. В их состав входят сфингозин, жирная кислота, несколько углеводов и, что особенно характерно, один или несколько остатков сиаловой кислоты.

Сиаловыми кислотами называют N-ацетильные производные нейраминной кислоты, которая представляет собой продукт конденсации маннозамина и пировиноградной кислоты.



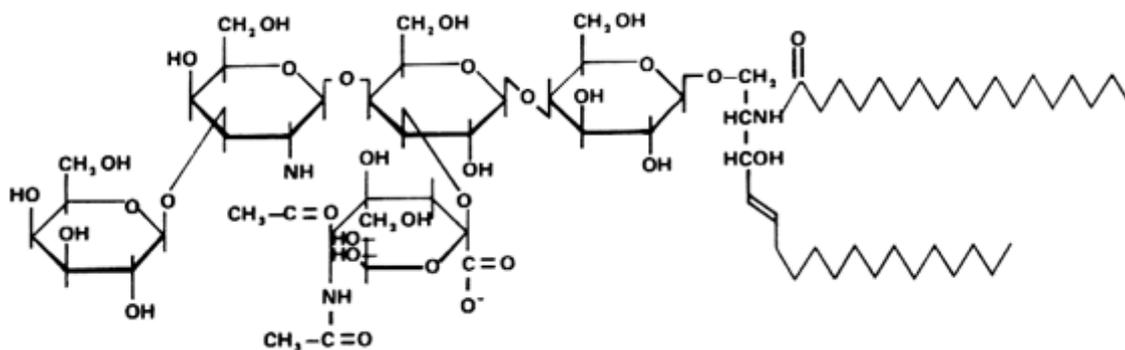
Сиаловая (N-ацетилнейраминная) кислота

В свободном виде сиаловые кислоты обнаружены в спинномозговой жидкости, слизистой оболочке желудка, щитовидной железе человека, икре некоторых видов рыб. Наиболее важную биологическую роль выполняют, входя в состав биополимеров животных клеток (гликолипиды, гликопротеины, олигосахариды молока и т.п.).

Доминирующей сиаловой кислотой, наиболее часто встречающейся в ганглиозидах, является N-ацетилнейраминная кислота (NeuNAc, NANA). Благодаря наличию карбоксильной группы в остатке N-ацетилнейраминной кислоты все ганглиозиды являются кислыми соединениями. Углеводы представлены гексозами (D-глюкоза и D-галактоза) и гексозаминами (N-ацетилглюкозамин, чаще N-ацетилгалактозамин). Ганглиозиды могут содержать от двух до десяти и более углеводных остатков.

Ганглиозиды в больших количествах находятся в нервной ткани. В сером веществе мозга ганглиозиды составляют около 6% мембранных липидов. Их выделяют из плазматических мембран эритроцитов, гепатоцитов, клеток селезенки и других тканей и органов.

Все ганглиозиды построены на основе моносиалоганглиозида Gm₁, олигосахаридная цепь которого содержит один остаток NANA.



Ганглиозид Gm₁

Согласно номенклатуре ганглиозиды обозначаются буквой G, например Gm₁. Буквами M, D, T и Q обозначают количество остатков сиаловой кислоты (моно-, ди-, три- и т.д.). Цифра обозначает специфическую последовательность углеводов в ганглиозидах.

Ганглиозиды – специфические детерминанты межклеточного взаимодействия, т.к. они играют важную роль в росте и дифференцировке тканей. Их углеводные «головки» выступают над поверхностью клетки и служат специфическими рецепторами ряда пептидных гормонов и некоторых бактериальных токсинов. Ганглиозидов обладают высокой тканевой специфичностью и выступают в роли антигенов клеточной поверхности.

Лекция 5

Аминокислотный состав белков

Белки и их функции

Белки □ это высокомолекулярные азотсодержащие соединения, состоящие из аминокислот, соединенных пептидной связью (-CO-NH-). Белки называют также *протеинами* (от гр. *protos* □ первый, важнейший).

Каждый белок характеризуется специфической аминокислотной последовательностью и индивидуальной пространственной структурой (конформацией). На долю белков приходится не менее 50% сухой массы органических соединений животной клетки. В организме человека насчитывается до 5 млн. различных видов белков. Белковая молекула может состоять из одной или нескольких цепей, содержащих от пятидесяти до нескольких сотен (иногда □ более тысячи) аминокислотных остатков. Молекулы, содержащие менее пятидесяти аминокислотных остатков, называют *пептидами*. В нативном состоянии белковые макромолекулы обладают специфической конформацией. Характерная для данного белка конформация определяется последовательностью аминокислотных остатков и стабилизируется водородными связями между пептидными и боковыми группами аминокислотных остатков, а также электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

В настоящее время широкое развитие при изучении структуры и функции белков получили *структурная геномика*, *протеомика* и *биоинформатика*. *Геномика* – комплексная наука, изучающая геномы живых организмов. *Структурная геномика* исследует содержание и организацию геномной информации. *Протеомика* как наука сформировалась на основе структурной геномики. Термин «протеомика» происходит от двух слов PROTEins (белки) и genOME (геном). Слово «протеин» является производным от греческого «*proteios*» – первоначальный. Это подчеркивает ключевую роль белков в реализации всех жизненных процессов, происходящих в биосфере. *Протеомику* можно определить как отрасль биологической науки, изучающую экспрессированные геномом белки: их состав, структуру, функциональные свойства,

механизмы регуляции активности, взаимодействия белков. Если целью геномики является инвентаризация генов, т. е. информационного материала клетки, то одной из основных целей современной протеомики является инвентаризация *протеома* – совокупности белков организма. В научной печати упоминание о протеоме впервые появилось в 1995 г. Следовательно, протеомика как наука сформировалась позже геномики и на ее основе.

Важное место в изучении структуры белков занимает биоинформатика. *Биоинформатика* – наука, занимающаяся изучением биологической информации с помощью математических, статистических и компьютерных методов. Биоинформатика как наука появилась на стыке молекулярной биологии, генетики, математики и компьютерных технологий. Ее основная задача – разработка вычислительных алгоритмов для анализа и систематизации данных о структуре и функциях нуклеиновых кислот и белков. Биоинформатика позволяет с помощью специальных компьютерных программ анализировать и обобщать научные результаты, полученные при исследовании протеома, предсказывать функции генов и зашифрованных в них белков, строить модели межбелкового взаимодействия, осуществлять дизайн белковых молекул.

Функции белков

Ферментативная. Белки катализируют реакции обмена веществ (пищеварение, дыхание и др.), мышечного сокращения, нервной проводимости.

Строительная. Структурные белки составляют основу костной и соединительной тканей, шерсти, роговых образований, формируют остов клеточных органелл (митохондрий, мембран и др.).

Сократительная. При посредстве белков сократительной системы (актина и миозина) по единому механизму осуществляются расхождение хромосом при делении клетки, движение жгутиков, работа мышц животных и человека.

Регуляторная. Регуляторные белки контролируют биосинтез белка и нуклеиновых кислот. К регуляторным белкам относятся также пептидно-белковые гормоны, которые секретируются эндокринными железами.

Рецепторная. С помощью специальных рецепторных белков наружной поверхности плазматической мембраны клеткой воспринимаются информация о состоянии внешней среды, различные регуляторные сигналы.

Транспортная. Транспортные белки, или белки-переносчики, участвуют в активной транспортировке ионов, липидов, сахаров и аминокислот через биологические мембраны.

Защитная. Защитные белки, к которым относятся иммуноглобулины, формируют защитные системы высших организмов. К защитным белкам относятся белки комплемента, отвечающие за лизис чужеродных клеток и активацию иммунологической функции, белки системы свертывания крови (тромбин, фибрин) и противовирусный белок интерферон.

Специальная. При участии белков биоэнергетической системы (например, родопсин, цитохромы) происходят преобразование и утилизация энер-

гии, поступающей в организм с питанием, а также энергии солнечного излучения.

Питательная. Пищевые и запасные белки (казеин, проламины) играют важную роль в развитии и функционировании организмов.

Элементарный состав белков

Каждый белок (или смесь функционально связанных белков) характеризуется отличным от других белков элементарным составом, однако все белки обязательно содержат пять элементов: *азот, углерод, кислород, водород и серу*. Их содержание в разных белках колеблется и составляет: углерода – 51-55%; кислорода – 21,5-23,5%; водорода – 6-7%; азота – 15-17,6%; серы – 0,3-2,5%. Обязательно присутствие углерода, водорода, кислорода и азота объясняется тем, что они входят в состав всех аминокислот. Большое отличие содержания серы в отдельных белках объясняется тем, что она входит в состав отдельных аминокислот (метионин, цистеин), содержание которых в разных белках различно.

Среднюю величину содержания азота в белках (16%) используют для расчета поступления белков с пищей и определения расхода белков организмом. Зная суммарное поступление азота с пищей или величину его выведения из организма в составе всех азотсодержащих конечных продуктов обмена, можно определить поступление или расход белка организмом. Для этого азот пищи или конечных продуктов обмена умножают на коэффициент 6,25 ($100/16=6,25$). Например, 15 г азота конечных продуктов обмена соответствует 93,75 г белка.

В состав некоторых белков входят фосфор, железо, медь, цинк, йод и некоторые другие элементы.

Методы выделения и очистки белков

Для подробного исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также изучения их химического состава и структуры непременным условием является получение белков в химически чистом, гомогенном состоянии. Последовательность операций по выделению белков такова: измельчение биологического материала (*гомогенизация*), извлечение белков (перевод их в растворенное состояние □ *экстракция*), выделение исследуемого белка из смеси других (*очистка и получение индивидуального белка*).

Обычные методы органической химии, применяемые для выделения веществ из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.) для белков неприемлемы, т.к. белки чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи). При повышении температуры белки подвергаются денатурации (теряют нативные свойства, в частности, растворимость, биологическую активность), поэтому разработаны эффективные методы выделения белков в

«мягких» условиях при низкой температуре (не выше 4°C), с применением щадящих нативную структуру химических реагентов.

Все методы разделения смесей основаны на том, что разделяемые компоненты в результате каких-либо манипуляций оказываются в разных участках системы и могут быть механически отделены друг от друга.

Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, т.к. на первых этапах очистки фракции содержат множество примесей. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс называют *фракционированием*.

На каждой стадии разделения белок должен находиться либо в виде раствора, либо в виде осадка.

Для осаждения с помощью дегидратации необходимо понизить растворимость белка. Растворимость белка зависит от их способности к гидратации. У глобулярных водорастворимых белков высокий уровень гидратации обеспечивается расположением гидрофильных групп на поверхности. Добавление органических растворителей понижает степень гидратации и приводит к осаждению белка. В качестве таких растворителей используют ацетон. Осаждают белки также с помощью солей, например сульфата аммония. Этот метод основан на том, что при повышении концентрации соли в растворе происходит сжатие ионных атмосфер, образуемых противоположными ионами белка, что способствует сближению их до критического расстояния, на котором межмолекулярные силы ван-дер-ваальсова притяжения перевешивают кулоновские силы отталкивания противоположных ионов. Это приводит к слипанию белковых частиц и их выпадению в осадок.

При изоэлектрическом осаждении заряд белков обусловлен остатками аспаратата и глутамата (отрицательный заряд) и остатками лизина и аргинина (положительный заряд). По мере повышения pH различными способами заряд белков проходит от положительных к отрицательным значениям и в изоэлектрической точке оказывается равен нулю. В результате белок лишается своей ионной атмосферы и его частицы слипаются, выпадая в осадок.

При центрифугировании выпавший осадок белка можно выделить фильтрованием. Частицы осажденного вещества под действием центробежной силы оседают на дне центрифужных стаканов и сжимаются в плотный осадок, с которого оставшийся раствор (надосадочная жидкость, или супернатант) легко сливается или отсасывается. Скоростные центрифуги (ультрацентрифуги) создают центробежное ускорение порядка 105g (т.е. 105 ускорений свободного падения), что позволяет осаждать даже некоторые крупные надмолекулярные агрегаты □ рибосомы и вирусы.

Сорбция основана на различном сродстве компонентов смесей к определенным веществам □ сорбентам. Наиболее часто используемый сорбент □ гель фосфата кальция (гидроксиапатит), или активированный уголь. Эффективную сорбцию можно получить на ионитах-сорбентах, имеющих на поверхности заряженные группы. В исходном состоянии эти заряды скомпенсированы какими-либо подвижными противоположными ионами. Практически при сорб-

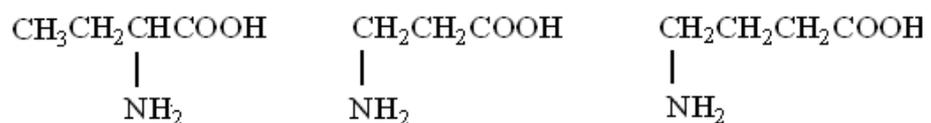
ции на ионитах происходит обмен этих противоионов. Если на поверхности сорбента находятся отрицательно заряженные группы, он связывает катионы и его называют катионитом. Соответственно сорбент с положительно заряженными группами называют анионитом. В качестве ионитов (после соответствующей химической обработки) чаще всего используют материалы на гидрофильной основе: целлюлозе, декстране, силикагеле или пористых стеклах.

Молекулярные сита представляют собой материалы с очень маленькими порами определенного размера. Следует отметить отличие этих «сит»: крупные частицы не остаются на поверхности материала «сита», а обтекают его частички (гранулы), тогда как мелкие вещества примесей диффундируют в частицы сита и таким образом задерживаются. Материалом для молекулярных сит могут служить сефадекс (полисахарид декстран, у которого после соответствующей обработки цепи оказываются сшитыми трехуглеродными мостиками) или полиакриламид, линейные цепи которого сшиты метиленовыми мостиками.

При перечисленных методах в конечной смеси остаются вспомогательные низкомолекулярные вещества □ органические растворители, соли и кислоты. Для очищения от них используется метод *диализа*. Он основан на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для белков. Чаще всего с этой целью используют пленки из целлофана (нитрат целлюлозы). В лаборатории подлежащий диализу раствор белка помещают в мешок из целлофана и погружают в сосуд с водой. Непрерывный ток воды через сосуд приводит к полному переходу в него всех проходящих через целлофан веществ, а белки остаются внутри.

Аминокислотный состав белков

Структурным компонентом белковой молекулы является аминокислота. *Аминокислотами называются органические кислоты, содержащие одну или несколько аминогрупп*. В зависимости от положения аминогруппы по отношению к карбоксилу различают α-, β- и γ-аминокислоты:



α-аминомасляная

β-аминопропионовая

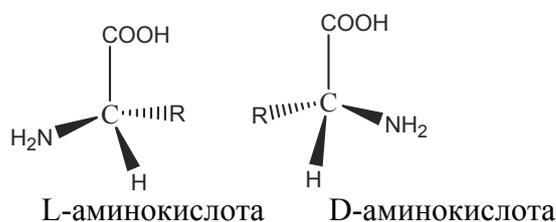
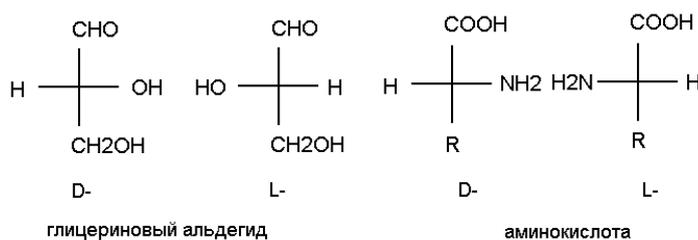
γ-аминомасляная

Все аминокислоты, за исключением глицина, имеют *хиральный* (асимметричный) центр, вследствие чего обладают *оптической активностью*. Хиральный центр □ атом углерода аминокислоты (у протеиногенных аминокислот это α-углерод), при котором имеются 4 разных заместителя:

1. радикал аминокислоты (-R);
2. карбоксильная группа (-COOH);

3. аминогруппа (-NH₂);
4. атом водорода (-H).

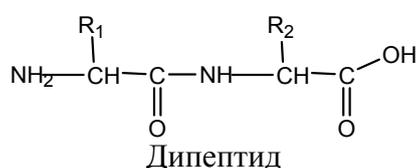
Конфигурация при асимметрическом углероде с максимальным номером определяет принадлежность к D- (аминогруппа справа) или L- (аминогруппа слева) ряду подобно тому, как в пространстве располагаются заместители у глицеринового альдегида. Аминокислоты, имеющие асимметрию, сходную с D-глицеральдегидом, относят к D-аминокислотам, аминокислоты, имеющие асимметрию, сходную с L-глицеральдегидом – к L-аминокислотам.



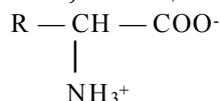
D- и L-изомеры – зеркальные изомеры соответствующей аминокислоты, называемые *энантиомерами*. *Рацемическая смесь* – смесь энантиомеров в равных мольных долях, не обладающая оптической активностью. D-изомеры аминокислот сладкие, L-изомеры – горькие или безвкусные. В составе белков млекопитающих имеются только L-изомеры. D-изомеры, наряду с L-изомерами, встречаются только у некоторых бактерий.

Химические свойства аминокислот

Поскольку аминокислоты имеют в своем составе как кислотную, так и основную группы, они способны реагировать и с кислотами, и с основаниями. Аминокислоты являются амфотерными органическими соединениями. В определенных условиях (например, при воздействии определенных ферментов) аминокислоты способны реагировать друг с другом. Связь, которой соединены остатки аминокислот, называется пептидной, а соединение, состоящее из двух остатков аминокислот, – дипептидом. Трипептиды, тетрапептиды и т.д. – полипептиды.

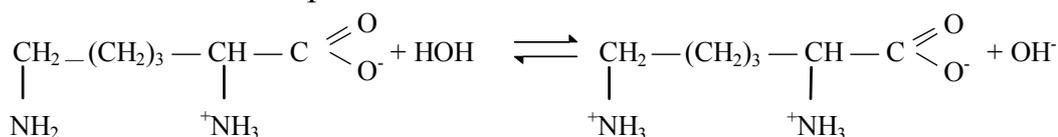


Как уже отмечалось, аминокислоты являются *амфотерными соединениями*, т.к. как содержат и кислотный (-COOH), и основной (-NH₂) центры. Следовательно, в нейтральной и близкой к ней среде они существуют в виде внутренних солей (биполярных ионов, или цвиттер-ионов).

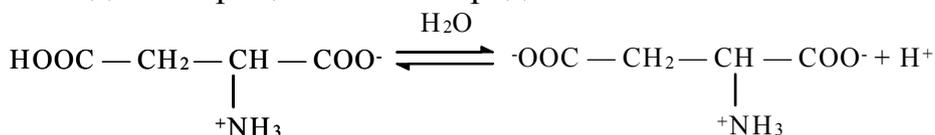


Кроме того, некоторые аминокислоты содержат в радикале дополнительные функциональные группы, способные к ионизации.

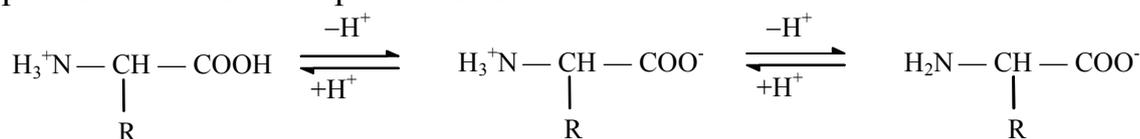
Основные аминокислоты в водном растворе дают щелочную реакцию и несут положительный заряд:



Кислые аминокислоты в водном растворе проявляют кислотные свойства и обладают отрицательным зарядом:

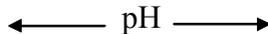


На диссоциацию аминокислот оказывает влияние pH среды. В очень кислых растворах группа -NH₂ протонирована полностью, а COOH-группа практически не ионизирована. В сильно щелочных растворах наоборот: при значениях pH от 4 до 9 каждая из диссоциирующих групп находится в равновесии со своей неионизированной формой, а обе группы вместе находятся в равновесии с биполярным ионом:



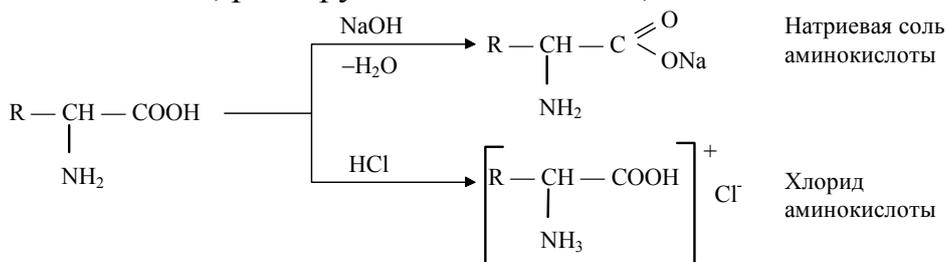
Катионная форма
сильно кислая среда
(pH < 5)

Биполярный ион (амфион)

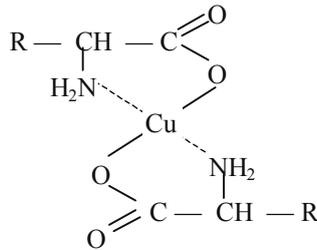


Анионная форма
сильно щелочная среда
(pH > 9)

Амфотерные свойства аминокислот проявляются и в их способности образовывать соли, реагируя как с кислотами, так и с основаниями:

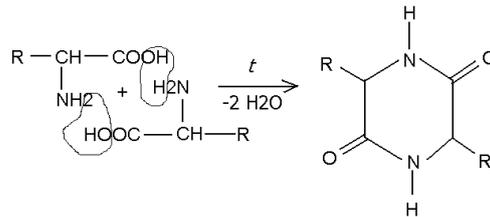


Еще одним проявлением амфотерности является способность аминокислот образовывать окрашенные растворимые комплексные соединения с Cu²⁺:

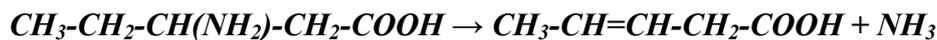


Если сумма зарядов на аминокислоте равна нулю, то значение рН носит название *изоэлектрической точки* (*pI*).

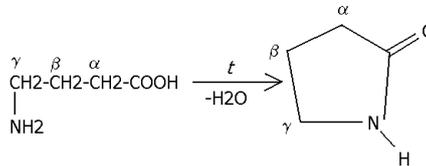
При нагревании в сухом виде различные аминокислоты ведут себя по разному. Так, α-аминокислоты образуют циклические дипептиды □ дикето-пиразины:



В отличие от них, β-аминокислоты претерпевают дезаминирование:



γ-аминокислоты превращаются в циклические внутримолекулярные пептиды □ лактамы:



Аминокислоты хорошо растворимы в воде, малорастворимы в органических растворителях; хорошо кристаллизуются; имеют высокую плотность и исключительно высокую температуру плавления. Эти свойства указывают на взаимодействие аминных и кислотных групп, вследствие чего аминокислоты в твёрдом состоянии и в растворе (в широком интервале рН) находятся в цвиттер-ионной форме. Взаимное влияние групп особенно ярко проявляется у α-аминокислот, где обе группы находятся в непосредственной близости.

Классификация аминокислот, заменимые и незаменимые аминокислоты

Все аминокислоты отличаются характером радикала, который может быть ациклическим или циклическим. В состав радикала может дополнительно входить вторая карбоксильная группа (такие аминокислоты называются моноаминодикарбоновые) или две аминных группы (диаминомонокарбоновые). В составе отдельных аминокислот могут находиться гидроксильные (серин, треонин), сульфгидрильная (цистеин) и метильная (метионин) группы.

Большинство аминокислот, участвующих в обменных процессах и входящих в состав белков, могут поступать с пищей или синтезироваться в организме в процессе обмена (из других аминокислот, поступающих в избытке). Они называются *заменимыми*. Некоторые аминокислоты не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей – это *незаменимые* аминокислоты. Таких аминокислот девять (*гистидин, триптофан, фенилаланин, лизин, метионин, треонин, изолейцин, лейцин, валин*).

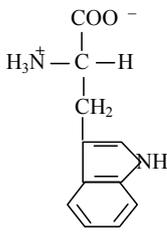
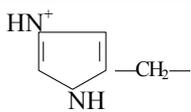
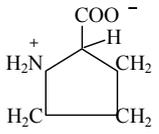
Практически все белки построены из двадцати α -аминокислот, принадлежащих (за исключением глицина) к L-ряду ([табл.5.1](#)).

Таблица 5.1

Протеиногенные аминокислоты

Название	Структура (<i>R-CH(NH₂)-COOH</i>)	3-х букв. межд. обозн.	3-х букв. межд. обозн.	1-букв. межд. обозн.	**
Глицин	<i>NH₂-CH₂-COOH</i>	Гли	Gly	G	
Аланин	<i>CH₃-CH(NH₂)-COOH</i>	Ала	Ala	A	
Валин	<i>(CH₃)₂CH-CH(NH₂)-COOH</i>	Вал	Val	V	Н
Лейцин	<i>CH₃-CH(CH₃)-CH₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Лей	Leu	L	Н
Изолейцин	<i>CH₃-CH₂-CH(CH₃)-CH(NH₂)-COOH</i>	Иле	Ile	I	Н
Серин	<i>HO-CH₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Сер	Ser	S	
Треонин	<i>CH₃-CH(OH)-CH(NH₂)-COOH</i>	Тре	Thr	T	Н
Цистеин	<i>HS-CH₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Цис	Cys	C	
Метионин	<i>CH₃-S-(CH₂)₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Мет	Met	M	Н
Лизин	<i>NH₂-(CH₂)₄-CH(NH₂)-COOH</i>	Лиз	Lys	K	Н
Аргинин	<i>NH₂-C(=NH)-NH-(CH₂)₃-CH(NH₂)-COOH</i>	Арг	Arg	R	ПЗ
Аспарагиновая к-та	<i>COOH-CH₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Асп	Asp	D	
Аспарагин	<i>NH₂-C(=O)-CH₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Асн	Asn	N	
Глутаминовая к-та	<i>HOOC-(CH₂)₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Глу	Glu	E	
Фенилаланин	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $	Фен	Phe	F	Н
Глутамин	<i>NH₂-C(=O)-(CH₂)₂-CH(NH₂)-COOH</i>	Глн	Gln	Q	
Тирозин	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $	Тир	Tyr	Y	ПЗ

Окончание табл.5.1

Название	Структура (R-CH(NH ₂)-COOH)	3-х букв. межд. обозн.	3-х букв. межд. обозн.	1-букв. межд. обозн.	**
Триптофан		Три	Trp	W	Н
Гистидин		Гис	His	Н	Н
Пролин		Про	Pro	Р	

Примечание: ** – Н □ незаменимая; ПЗ – полузаменимая; остальные – заменимые.

Аминокислоты классифицируются по:

1) строению; 2) характеру заряженности; 3) заменимости-незаменимости.

Классификация по строению:

1. моноаминомонокарбоновые
2. диаминомонокарбоновые (лизин, аргинин, цитруллин)
3. моноаминодикарбоновые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты)
4. диаминодикарбоновые (цистин).

Название аминокислот по номенклатуре IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – Международный союз чистой и прикладной химии) формируется так, как у карбоновых кислот вообще, с перечислением заместителей, например, имеющих в углеродной цепи. Лизин, имеющий строение NH₂-(CH₂)₄-CH(NH₂)-COOH будет называться 2,6-диаминогексановой, серин – 2-амино-3-гидроксипропановой. На практике названия по номенклатуре IUPAC по отношению к протеиногенным аминокислотам не применяют, обходясь исторически сложившимися тривиальными названиями. Исключение составляют лишь аспарагиновая и глутаминовая кислоты, для которых часто используют названия «аспартат» и «глутамат».

Очень важным свойством аминокислот является строение бокового радикала R, поскольку остальная часть молекулы, включающая карбоксильную группу, аминогруппу, ассиметричный атом углерода и водород для всех протеиногенных аминокислот совершенно одинакова: CH(NH₂)-COOH.

Наличие в боковом радикале R функциональных групп, таких, как сульфгидрильная –SH, карбаминовая H₂N-C(=O)-, гидроксильная HO-, ами-

ногруппа H_2N -, карбоксильная $HOOC$ - и другие, оказывает решающее влияние не только на формирование вторичной, третичной и четвертичной структур белковой молекулы, но и на ее биологические функции. В водных средах при различных значениях рН эти группы отвечают за величину электрических зарядов белковой молекулы, ее растворимость и ряд других физико-химических свойств. Например, замена одного аминокислотного остатка (глутаминовой кислоты в положении 6) в полипептидной цепи субъединицы гемоглобина на остаток валина приводит к такому изменению свойств молекулы гемоглобина, что это вызывает патологию, называемую «серповидноклеточной анемией».

По характеру заряженности боковых радикалов аминокислоты подразделяют на:

неполярные гидрофобные (Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Фен, Тир, Три, Мет);

полярные, но незаряженные (Сер, Тре, Цис, Асн, Глн);

полярные с отрицательным зарядом (Асп, Глу);

полярные с положительным зарядом (Лиз, Арг, Гис).

В зависимости от того, могут ли аминокислоты синтезироваться в организме или должны поступать в составе пищи, различают:

заменимые;

незаменимые (лейцин, изолейцин, валин, лизин, гистидин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан). В детском возрасте также незаменимой является аминокислота аргинин.

Для человека Арг, Тир – полузаменимые, а для курицы – незаменимые.

Лекция 6

Уровни структурной организации белков

Структурная организация белков

Каждый белок характеризуется специфической аминокислотной последовательностью и индивидуальной пространственной структурой (конформацией). На долю белков приходится не менее 50% сухой массы органических соединений животной клетки. В организме человека насчитывается до 5 млн. различных видов белков. Белковая молекула может состоять из одной или нескольких цепей, содержащих от пятидесяти до нескольких сотен (иногда \square более тысячи) аминокислотных остатков. Молекулы, содержащие менее пятидесяти остатков, относят к пептидам. В состав многих молекул входят остатки цистеина, дисульфидные связи которых ковалентно связывают участки одной или нескольких цепей. В нативном состоянии белковые макромолекулы обладают специфической конформацией. Характерная для данного белка конформация определяется последовательностью аминокислотных остатков и стабилизируется водородными связями между пептидными и

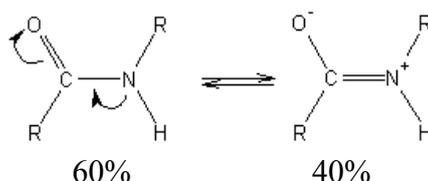
боковыми группами аминокислотных остатков, а также электростатическими и гидрофобными взаимодействиями.

Первичная структура белка: методы исследования. Структурные особенности пептидной связи

Пептидная связь образуется при реакции аминогруппы одной аминокислоты и карбоксильной группы другой с выделением молекулы воды:

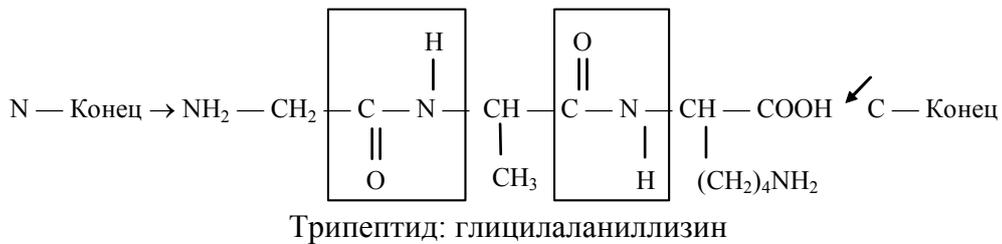


Связанные пептидной связью аминокислоты образуют полипептидную цепь. Пептидная связь имеет плоскостную структуру: атомы С, О и N находятся в sp^2 -гибридизации; у атома N имеется р-орбиталь с неподеленной парой электронов; образуется р- π -сопряженная система, приводящая к укорочению связи С–N (0,132 нм) и ограничению вращения (барьер вращения составляет ~63 кДж/моль). Пептидная связь имеет преимущественно *транс*-конфигурацию относительно плоскости пептидной связи. Подобное строение пептидной связи сказывается на формировании вторичной и третичной структуры белка. *Пептидная связь* □ жесткая, ковалентная, генетически детерминированная. В структурных формулах изображается в виде одинарной связи, однако на самом деле эта связь между углеродом и азотом носит характер частично двойной связи:



Это вызвано различной электроотрицательностью атомов С, N и О. Вокруг пептидной связи вращение невозможно, все четыре атома лежат в одной плоскости, т.е. компланарны. Вращение же других связей вокруг полипептидного остова достаточно свободно.

Первичная структура была открыта профессором Казанского университета А.Я. Данилевским в 1989 г. В 1913 году Э. Фишером были синтезированы первые пептиды. Последовательность аминокислот для каждого белка уникальна и закреплена генетически.



Для определения первичной структуры отдельной, химически гомогенной полипептидной цепи методом гидролиза выясняют аминокислотный состав: соотношение каждой из двадцати аминокислот в образце гомогенного полипептида. Затем приступают к определению химической природы концевых аминокислот полипептидной цепи, содержащей одну свободную NH₂-группу и одну свободную COOH-группу.

Для определения природы *N-концевой аминокислоты* предложен ряд методов, в частности, метод Сэнжера (за его разработку Ф. Сэнжер был удостоен Нобелевской премии в 1958 г.). Этот метод основан на реакции арилирования полипептида 2,4-динитрофторбензолом. Раствор полипептида обрабатывают 2,4-динитрофторбензолом, который взаимодействует со свободной α-аминогруппой пептида. После кислотного гидролиза продукта реакции только одна аминокислота оказывается связанной с реактивом в виде 2,4-динитрофениламинокислоты. В отличие от других аминокислот она имеет желтый цвет. Ее выделяют из гидролизата и идентифицируют методом хроматографии.

Для определения *C-концевой аминокислоты* часто используют ферментативные методы. Обработка полипептида карбоксипептидазой, которая разрывает пептидную связь с того конца пептида, где содержится свободная COOH-группа, приводит к освобождению C-концевой аминокислоты, природа которой может быть идентифицирована методом хроматографии. Существуют и другие методы определения C-концевой аминокислоты, в частности, химический метод Акабори, основанный на гидразинолизе полипептида.

Следующий этап работы связан с определением последовательности аминокислот в полипептиде. Для этого вначале проводят частичный (химический и ферментативный) гидролиз полипептидной цепи на короткие пептидные фрагменты, последовательность которых может быть точно определена. После гидролиза с помощью электрофореза и хроматографии составляют пептидные карты. Затем устанавливают последовательность аминокислот в выделенных пептидах и первичную структуру всей молекулы.

Номенклатура пептидов и полипептидов. Природные пептиды: глутатион, карнозин, ансерин, грамицидин S, окситоцин, энкефалины

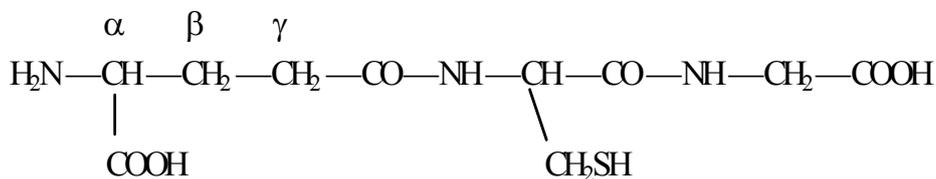
Пептиды □ природные или синтетические соединения, молекулы которых построены из остатков α-аминокислот, соединенных пептидными (амидными) связями. Пептиды могут содержать также неаминокислотную компоненту. По числу аминокислотных остатков, входящих в молекулы пеп-

тидов, различают дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и т.д. Пептиды, содержащие до десяти аминокислотных остатков, называются *олигопептидами*, содержащие более десяти аминокислотных остатков – *полипептидами*. Природные полипептиды с молекулярной массой более 6000 называются *белками*.

Аминокислотный остаток пептидов, несущий свободную α-аминогруппу, называется N-концевым, а остаток, несущий свободную α-карбоксильную группу – С-концевым. Название пептида образуется из названий входящих в его состав аминокислотных остатков, перечисляемых последовательно, начиная с N-концевого. При этом используют тривиальные названия аминокислот, в которых суффикс "ин" заменяется на "ил". Исключение составляет С-концевой остаток, название которого совпадает с названием соответствующей аминокислоты. Все аминокислотные остатки, входящие в пептиды, нумеруются, начиная с N-конца. Для записи первичной структуры пептида (аминокислотной последовательности) широко используют трех- и однобуквенные обозначения аминокислотных остатков (например, Ala-Ser-Asp-Phe-Gly – это аланил-серил-аспарагил-фенилаланил-глицин).

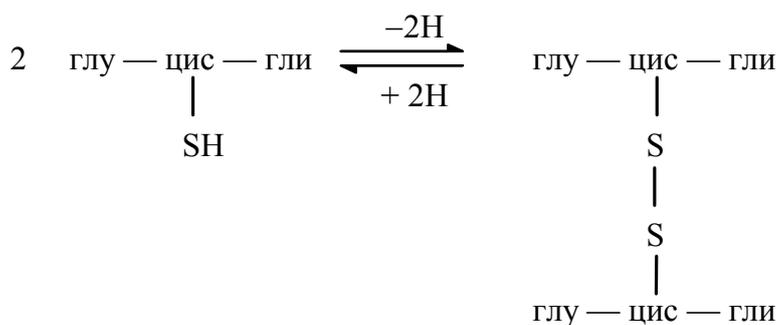
Отдельные представители пептидов

Глутатион — трипептид γ-глутамилцистеинилглицин, содержащийся во всех животных и растительных клетках, бактериях.

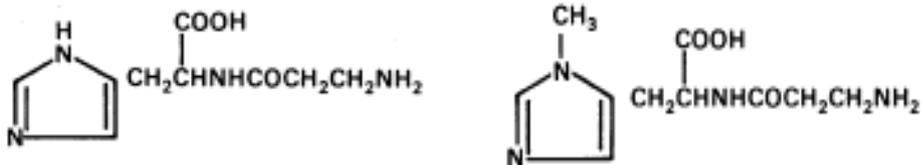


Глутатион

Глутатион участвует в ряде окислительно-восстановительных процессов. Он выполняет функцию антиоксиданта. Это обусловлено наличием в его составе цистеина и определяет возможность существования глутатиона в восстановленной и окисленной формах.



Карнозин (от лат. *carnosus* □ мясной, *caro* □ мясо), $C_9H_{14}O_3N_4$, – дипептид (β -аланилгистидин), состоящий из аминокислот β -аланина и L-гистидина. Открыт в 1900 г. В. С. Гулевичем в мясном экстракте. Молекулярная масса 226, кристаллизуется в виде бесцветных игл, хорошо растворим в воде, нерастворим в спирте. Содержится в скелетной мускулатуре большинства позвоночных. Среди рыб встречаются виды, у которых карнозин и составляющие его аминокислоты отсутствуют (либо присутствует только L-гистидин или только β -аланин). В мышцах беспозвоночных карнозина нет. Содержание карнозина в мышцах позвоночных колеблется обычно от 200 до 400 мг% их сырой массы и зависит от их структуры и функции; у человека □ около 100-150 мг%.

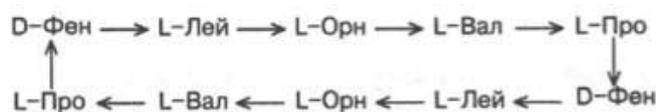


Карнозин (β -аланил-L-гистидин) Ансерин (β -аланил-1-метил- L-гистидин)

Влияние карнозина на биохимические процессы, протекающие в скелетных мышцах, разнообразно, однако окончательно биологическая роль карнозина не установлена. Добавление карнозина к раствору, омывающему мышцу изолированного нервно-мышечного препарата, вызывает восстановление сокращений утомлённой мышцы.

Дипептид *ансерин* (N-метилкарнозин или β -аланил-1-метил- L-гистидин), сходный по строению с карнозином, в мышцах человека отсутствует, но имеется в скелетных мышцах тех видов, мышцы которых способны к быстрым сокращениям (мышцы конечностей кролика, грудная мышца птиц). Физиологические функции β -аланил-имидазольных дипептидов не вполне ясны. Возможно, они выполняют буферные функции и поддерживают pH в скелетной мышце, сокращающейся в анаэробных условиях. Однако ясно, что *карнозин* и *ансерин* стимулируют АТФ-азную активность миозина *in vitro*, увеличивают амплитуду мышечного сокращения, предварительно сниженную утомлением. Академик С.Е. Северин показал, что имидазолсодержащие дипептиды не влияют непосредственно на сократительный аппарат, но увеличивают эффективность работы ионных насосов мышечной клетки. Оба дипептида образуют хелатные комплексы с медью и способствуют поглощению этого металла.

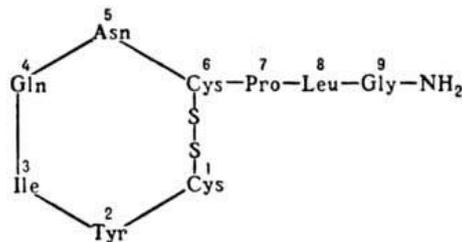
Антибиотик *граммицидин S* выделен из *Bacillus brevis* и представляющий собой циклический декапептид:



Граамицидин S

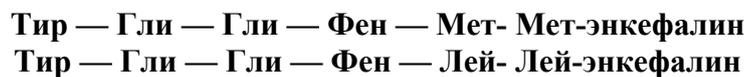
В структуре *грамицидина S* имеются 2 остатка орнитина, производные аминокислоты аргинина и 2 остатка D-изомеров фенилаланина.

Окситоцин – гормон, вырабатываемый нейросекреторными клетками передних ядер гипоталамуса и затем переносимый по нервным волокнам в заднюю долю гипофиза, где он накапливается и откуда выделяется в кровь. Окситоцин вызывает сокращение гладких мышц матки и в меньшей степени – мышц мочевого пузыря и кишечника, стимулирует отделение молока молочными железами. По химической природе окситоцин – октапептид, в молекуле которого 4 остатка аминокислот связаны в кольцо цистином, соединённым также с трипептидом: Pro-Leu-Gly.



ОКСИТОЦИН

Рассмотрим *нейропептиды (опиатные пептиды)*. Первые два представителя нейропептидов, названные энкефалинами, были выделены из мозга животных:



Эти пептиды обладают обезболивающим действием и используются как лекарственные средства.

Вторичная структура белков: α-спираль, ее основные характеристики, β-структура, β-изгиб. Роль водородных связей в формировании вторичной структуры. Сверхвторичные (надвторичные) структуры белка

Вторичная структура – это пространственное расположение полипептидной цепочки в виде α-спирали или β-складчатости безотносительно к типам боковых радикалов и их конформации.

Л. Полинг и Р. Кори предложили модель вторичной структуры белка в виде α-спирали, в которой водородные связи замыкаются между каждой первой и четвертой аминокислотой, что позволяет сохранять нативную структуру белка, осуществлять простейшие функции, защищать от разрушения. В образовании водородных связей принимают участие все пептидные группы,

что обеспечивает максимальную стабильность, снижает гидрофильность и увеличивает гидрофобность белковой молекулы. α -спираль образуется самопроизвольно и является наиболее устойчивой конформацией, отвечающей минимуму свободной энергии.

Наиболее распространенным элементом вторичной структуры является правая α -спираль (α_R). Пептидная цепь здесь изгибается винтообразно. На каждый виток приходится 3,6 аминокислотного остатка, шаг винта, т.е. минимальное расстояние между двумя эквивалентными точками, составляет 0,54 нм; α -спираль стабилизирована почти линейными водородными связями между NH-группой и CO-группой четвертого по счету аминокислотного остатка. Таким образом, в протяженных спиральных участках каждый аминокислотный остаток принимает участие в формировании двух водородных связей. Неполярные или амфифильные α -спирали с 5-6 витками часто обеспечивают закоривание белков в биологических мембранах (трансмембранные спирали). Зеркально-симметричная относительно α_R -спирали левая α -спираль (α_L) встречается в природе крайне редко, хотя энергетически возможна. Закручивание полипептидной цепи белка в спиралеобразную структуру происходит вследствие взаимодействия между кислородом карбонильной группы i -того аминокислотного остатка и водородом амидогруппы $(i+4)$ -аминокислотного остатка посредством образования водородных связей (рис.6.1).

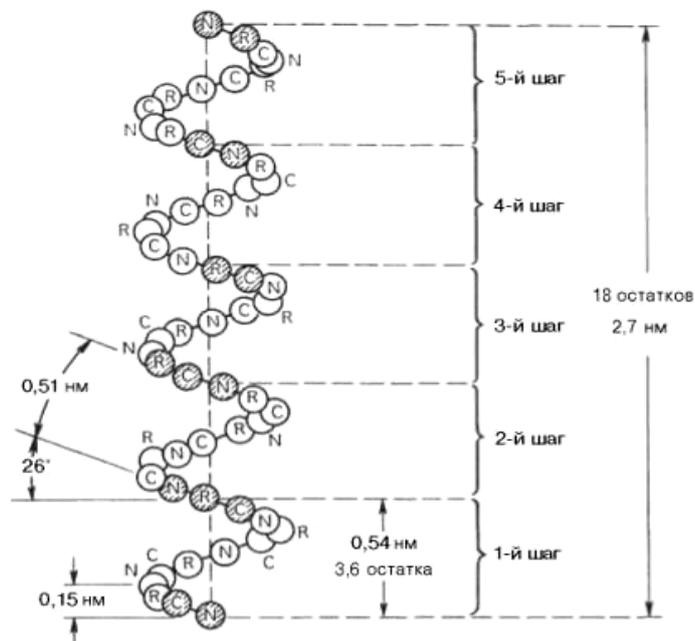


Рис. 6.1. Вторичная структура белка: α -спираль

Другая форма спирали присутствует в коллагене, важнейшем компоненте соединительных тканей. Это левая спираль коллагена с шагом 0,96 нм и при остатке в 3,3 в каждом витке более пологая по сравнению с α -спиралью. В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь

невозможно. Структура стабилизирована за счет скручивания трех пептидных цепей в правую тройную спираль.

Наряду с α -спиралями в образовании вторичной структуры белка принимают также участие β -структуры, β -изгиб.

В отличие от конденсированной α -спирали β -слои почти полностью вытянуты и могут располагаться как параллельно, так и антипараллельно (рис.6.2).

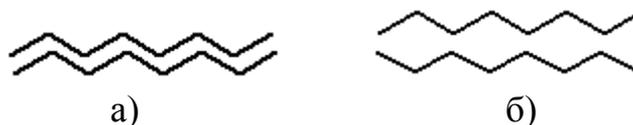


Рис. 6.2. Параллельное (а) и антипараллельное (б) расположение β -слоев

В складчатых структурах также образуются поперечные межцепочечные водородные связи (рис.6.3). Если цепи ориентированы в противоположных направлениях, структура называется антипараллельным складчатым листом (β_a); если цепи ориентированы в одном направлении, структура называется параллельным складчатым листом (β_n). В складчатых структурах α -С-атомы располагаются на перегибах, а боковые цепи ориентированы почти перпендикулярно средней плоскости листа, попеременно вверх и вниз. Энергетически предпочтительной оказывается β_a -складчатая структура с почти линейными Н-мостиками. В растянутых складчатых листах отдельные цепи чаще всего не параллельны, а несколько изогнуты относительно друг друга.

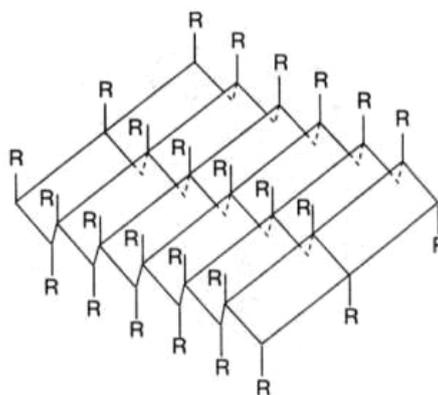


Рис. 6.3. β -складчатая структура

Кроме регулярных в полипептидных цепях есть еще и нерегулярные вторичные структуры, т.е. стандартные структуры, не образующие длинных периодических систем. Это – β -изгибы они называются так потому, что часто стягивают верхушки соседних β -тяжей в антипараллельных β -шпильках). В изгибы обычно входит около половины остатков, не опавших в регулярные структуры белков.

Супервторичная структура – это более высокий уровень организации белковой молекулы, представленный ансамблем взаимодействующих между собой вторичных структур:

1. α -спираль – два антипараллельных участка, которые взаимодействуют гидрофобными комплементарными поверхностями (по принципу «впадина-выступ»);
2. сверхспирализация α -спирали;
3. $\beta\alpha\beta$ – два параллельных участка β -цепи;
4. β -зигзаг.

Встречаются разнообразные способы укладки белковой цепи (рис. 6.5). [Рисунок 6.5](#) взят с обложки журнала Nature 1977 г. (v.268, №.5620), где была напечатана статья Дж. Ричардсона о мотивах укладки белковых цепей.

Домен – компактная глобулярная структурная единица внутри полипептидной цепи. Домены могут выполнять разные функции и подвергаться свертыванию в независимые компактные глобулярные структурные единицы, соединенные между собой гибкими участками внутри белковой молекулы.

Третичная структура белков. Типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру. Роль S-S-мостиков в формировании третичной структуры некоторых белков

Под *третичной структурой* понимают пространственное расположение полипептидной цепи (способ укладки цепи в определенном объеме). В стабилизации пространственной структуры основную роль играют нековалентные связи. К ним относятся *водородные связи*, *электростатические взаимодействия заряженных групп*, *межмолекулярные ван-дер-ваальсовы силы*, *взаимодействия неполярных боковых радикалов аминокислот (гидрофобные взаимодействия)*, *диполь-дипольные взаимодействия*. Кроме того, важную роль в формировании третичной структуры играют дисульфидные связи (S-S-мостики) ([рис.6.4](#)).

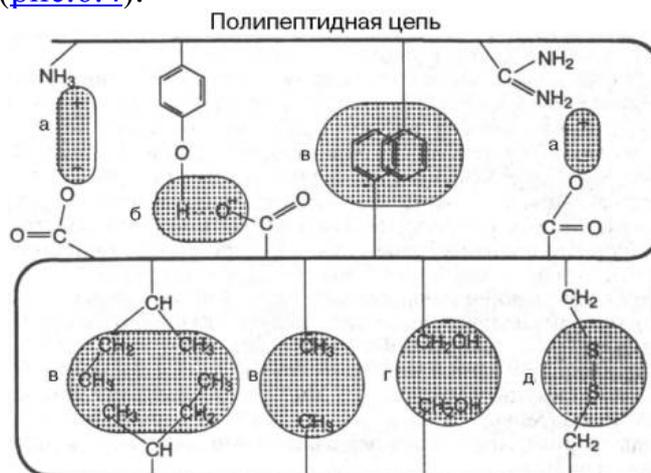


Рис. 6.4. Связи, стабилизирующие третичную структуру белка: а) электростатические силы; б) водородная связь; в) гидрофобное взаимодействие; г) диполь-дипольные взаимодействия; д) дисульфидная связь

Дисульфидные связи образуются при окислении сближенных в пространственной структуре белка остатков цистеина в остатки цистина. Счита-

ют, что дисульфидные связи, часто множественные, особенно важны для стабилизации маленьких белков, в которых не может возникнуть обширной системы нековалентных взаимодействий.

Третичная структура – уникальное для каждого белка расположение в пространстве полипептидной цепи, зависящее от количества и чередования аминокислот, т.е. predetermined первичной структурой белка. Конфигурация белковых молекул может быть фибриллярной и глобулярной. Третичная структура многих белков составляется из нескольких компактных глобул, называемых *доменами*. Между собой домены обычно бывают связаны тонкими перемычками □ вытянутыми аморфными полипептидными цепями (рис.6.5).

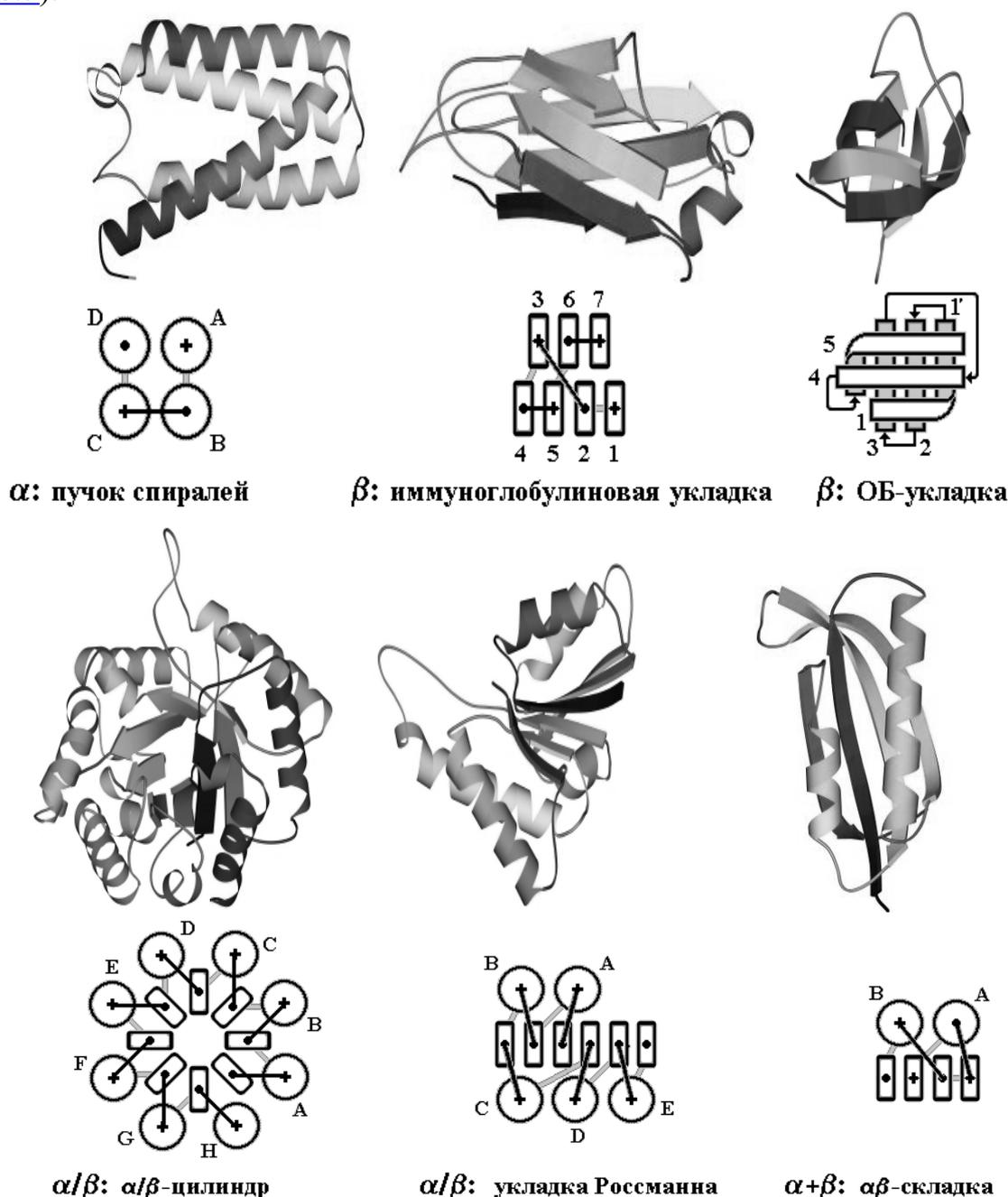


Рис. 6.5. Характерные мотивы укладки белковой цепи

Кроме того, в белках встречаются мотивы укладки полипептидной цепи, похожие на орнаменты на индейских и греческих вазах: мотив меандра, мотив греческого ключа, мотив зигзага-"молнии" (рис. 6.6).

При свертывании белковой глобулы значительная часть (не менее половины) гидрофобных радикалов аминокислотных остатков оказывается скрытой от контакта с окружающей белок водой. Происходит образование своеобразных внутримолекулярных «гидрофобных ядер». В них особенно представлены объемные остатки лейцина, изолейцина, фенилаланина, валина.

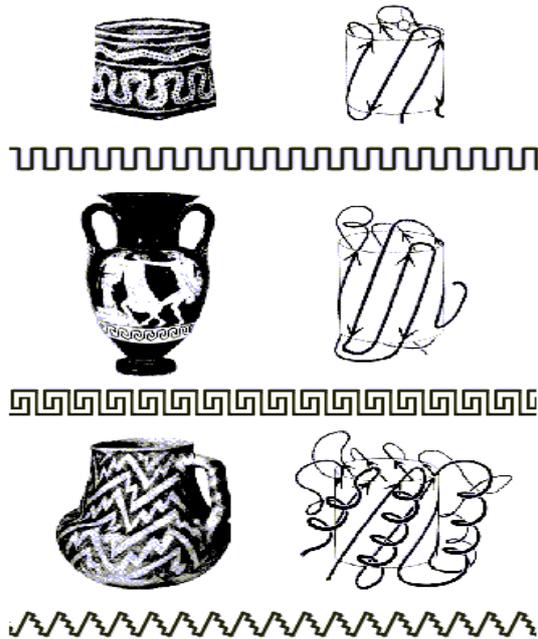


Рис.6.6. Мотивы укладки белковой цепи и орнаменты на индейских и греческих вазах. Вверху: мотив меандра; в середине: мотив греческого ключа; внизу: мотив зигзага-"молнии"

С появлением третичной структуры у белка появляются новые свойства – биологические. В частности, проявление каталитических свойств связано с наличием у белка третичной структуры. И наоборот, нагревание белков, приводящее к разрушению третичной структуры (денатурация), приводит к утрате биологических свойств.

Четвертичная структура белков. Количество и типы субъединиц. взаимодействия между субъединицами, стабилизирующие четвертичную структуру. Функциональное значение четвертичной структуры белков

Четвертичная структура – это надмолекулярное образование, состоящее из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентно, а водородными связями, электростатическими, диполь-дипольными и гидрофобными взаимодействиями между остатками аминокис-

лот, находящихся на поверхности. Примером может служить молекула гемоглобина, вирус табачной мозаики (2130 субъединиц).

Каждый из белков-участников третичной структуры при образовании четвертичной структуры называют *субъединицей* или *протомером*. Образованную молекулу называют олигомером, или мультимером. Олигомерные белки чаще построены из четного количества протомеров с одинаковыми или разными молекулярными массами. В образовании четвертичной структуры белка принимают участие те же связи, что и при образовании третичной структуры, за исключением ковалентных.

Объединение белковых молекул третичной структуры без появления новых биологических свойств называют агрегированным состоянием. Как четвертичная структура, так и агрегированное состояние могут быть обратимо разрушены с применением детергентов, в частности, додецилсульфата натрия или неионных детергентов типа тритона. Очень часто для разрушения четвертичной структуры исследуемый белок нагревают при 100°C в присутствии 1%-ного 2-меркаптоэтанола и 2%-ного додецилсульфата натрия. В таких условиях восстанавливаются -S-S-связи между остатками Cys, которые в некоторых случаях удерживают субъединицы четвертичной структуры.

Субъединицы, образующие четвертичную структуру белка, могут быть различными как по строению, так и по функциональным свойствам (гетеромеры). Это позволяет объединить в одной структуре несколько взаимосвязанных функций, создать полифункциональную молекулу. Например, в протеинкиназе, стехиометрия четвертичной структуры которой отвечает формуле C_2R_2 , субъединица C ответственна за ферментативную активность, осуществляя перенос фосфатного остатка от АТФ на белок; субъединица R является регуляторной. В отсутствие циклического АМР последняя связана с C-субъединицей и ингибирует ее. При образовании комплекса с сАМР четвертичная структура распадается и C-субъединицы оказываются способными фосфорилировать белковые субстраты. В гомомерных белках субъединицы одинаковы.

подавляющая часть белков, имеющих четвертичную структуру, приходится на димеры, тетрамеры и гексамеры, последние встречаются у белков с молекулярной массой, большей 100 кДа.

Характерной особенностью белков с четвертичной структурой является их способность к самосборке. Взаимодействие протомеров осуществляется с высокой специфичностью, благодаря образованию десятка слабых связей между контактными поверхностями субъединиц, поэтому ошибки при формировании четвертичной структуры белков исключены.

Практически все белки-ферменты имеют четвертичную структуру и состоят, как правило, из четного числа протомеров (двух, четырех, шести, восьми). Четвертичная структура белка подразумевает такое объединение белков третичной структуры, при котором появляются новые биологические свойства, не характерные для белка в третичной структуре. В частности, такие эффекты, как *кооперативный* и *аллостерический*, характерны лишь для белков с четвертичной структурой.

Четвертичная структура – последний уровень в организации белковой молекулы, причем не обязательный – до половины известных белков ее не имеют.

Лекция 7

Физико-химические свойства белков

Ионизация, гидратация, растворимость, осмотические и онкотические свойства, оптические свойства

Физико-химические свойства белков зависят в основном от свойств боковых радикалов аминокислот, входящих в их состав, а также от количества свободных функциональных групп, в том числе аминных и карбоксильных, которые не были использованы для образования пептидных связей. Белки характеризуются высокой вязкостью растворов, незначительной диффузией, способностью к набуханию в больших пределах, оптической активностью, подвижностью в электрическом поле, низким осмотическим и высоким онкотическим давлением, способностью к поглощению УФ-лучей при 280 нм (это свойство, обусловленное наличием в белках ароматических аминокислот, используется для количественного определения белков).

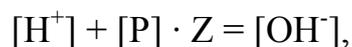
Многие белки хорошо растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп (–ОН, –NH₂, –COOH и др.). Растворимые белки – гидрофильные *коллоиды*, активно связывающие воду; их растворы обладают значительной вязкостью, низким осмотическим давлением. Различные белки растворяются по-разному. Белки опорных тканей (кератин, проколлаген, коллаген, эластин и др.) нерастворимы в воде. Растворимость белка в воде зависит от характера белка, реакции среды и присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислыми свойствами (альбумины, глобулины, проламины, глютенины); щелочные белки (протамины, гистамины) лучше растворяются в щелочной среде. Различия в растворимости отмечаются как среди кислых, так и среди щелочнореагирующих белков. Альбумины растворяются в дистиллированной воде, а глобулины растворяются в воде только в присутствии электролитов. Белки, как и аминокислоты, амфотерны благодаря наличию свободных NH₂- и COOH-групп. Для них характерны все свойства кислот и оснований. В зависимости от реакции среды и соотношения кислых и основных аминокислот белки в растворе несут отрицательный или положительный заряд, перемещаясь к аноду или катоду. Это свойство используется при очистке белков методом электрофореза.

Белки обладают явно выраженными гидрофильными свойствами. Молекулы белка не способны проникать через полупроницаемые искусственные мембраны (целлофан, пергамент, коллодий), а также биомембраны растительных и животных тканей.

Характерной константой белков является изоэлектрическая точка – pI . В изоэлектрической точке суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен нулю и белки не перемещаются в электрическом поле. Зная аминокислотный состав белка, можно приближенно определить изоэлектрическую точку. Изоэлектрическая точка большинства белков животных тканей лежит в пределах от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о частичном преобладании кислых аминокислот. Однако в природе имеются белки, у которых значения изоэлектрических точек лежат в крайних значениях pH среды. В частности, величина pI пепсина (фермент желудочного сока) равна единице, сальмина (основной белок из молока семги) – почти двенадцати.

В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок. Изоэлектрическая точка белка в сильной степени зависит от присутствия в растворе ионов солей; в то же время на ее величину не влияет концентрация белка.

В химии белков существует понятие «изоионная точка белка». Раствор белка называется изоионным, если он не содержит никаких других ионов, кроме ионизированных остатков аминокислот белковой молекулы и ионов, образующихся при диссоциации воды. Для освобождения белка от посторонних ионов его раствор обычно пропускают через колонку, наполненную смесью анионо- и катионообменников. Изоионной точкой данного белка принято называть значение pH изоионного раствора этого белка:



где $[P]$ – молярная концентрация белка; Z – средний заряд молекулы.

Согласно этому уравнению, изоионная точка белка зависит от его концентрации. Очевидно, поэтому белок, за исключением случая, когда pI равно семи, не может быть одновременно изоэлектрическим и изоионным.

Белки обладают *оптической активностью* (способностью вещества вращать плоскость поляризации проходящего через него света), поскольку состоят из аминокислот, которые являются энантиомерами.

Все белки, как правило, поглощают ультрафиолетовый свет. На этом свойстве основан спектрофотометрический метод определения белков (по интенсивности поглощения при 280 нм). Обусловлено поглощение в УФ области спектра присутствием в белке ароматических аминокислот – Trp, Tyr, Phe. Условно принято, одна единица оптической плотности раствора при 280 нм соответствует концентрации белка, равной примерно 1 мг/мл (при толщине кюветы 1 см).

Белковые растворы обладают также способностью флуоресцировать – испускать квант света при переходе из электронно-возбужденного состояния в основное. Флуоресцирующими аминокислотными остатками в белках являются Trp, Tyr, Phe.

В видимом диапазоне (380-780 нм) можно определять содержание окрашенных белков – хромопротеинов (гемоглобина, цитохромов и др.). В инфракрасной области спектра (780-10000 нм) поглощают все белки. ИК-

спектры используют для определения α -спиральных, β -структурных и аморфных участков в белковых молекулах.

Для растворов белка характерен эффект Тиндаля – рассеивание света белковыми частицами (при боковом освещении виден светящийся конус).

Молекулярная масса и размеры белков. Методы определения молекулярной массы белков. Необходимость применения комплекса методов для точной оценки молекулярной массы белков

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков, объединенных в макромолекулярную структуру. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 (нижний предел) до 1000000 и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Такие полипептидные цепи называются субъединицами. Их молекулярная масса варьирует в широких пределах: от 6000 до 100000 и более. Для выражения молекулярной массы белков используют также специальную единицу – дальтон.

Дальтон (Да) – единица массы, практически равная массе атома водорода (т.е. 1,0000 по шкале атомных масс). Терминами «дальтон» и «молекулярная масса» пользуются как взаимозаменяемыми: например, белок в 20000 дальтон имеет молекулярную массу 20000. Наименование дано в честь Джона Дальтона, разработавшего атомарную теорию строения материи. Килодальтон (кДа) – единица массы, равная 1000 дальтон. Масса большинства белков лежит в пределах от 10 до 100 кДа.

Аминокислотный состав и последовательность аминокислот выяснены для многих тысяч белков. В связи с этим стало возможным вычисление их молекулярной массы химическим путем с высокой точностью. Однако для огромного количества встречающихся в природе белков химическое строение не выяснено, поэтому основными методами определения молекулярной массы все еще остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.). На практике чаще всего используются методы седиментационного анализа, гель-хроматография и гель-электрофорез.

При определении молекулярной массы белков методами седиментационного анализа используют аналитические ультрацентрифуги (первая ультрацентрифуга была сконструирована в 1923 г. Т. Сведбергом), в которых удается создать центробежные ускорения (g), в 200000 и более раз превышающие ускорение земного притяжения. Обычно молекулярную массу вычисляют по скорости седиментации молекул белка или седиментационному равновесию. По мере перемещения молекул от центра к периферии образуется резкая граница «растворитель-белок» (регистрируется автоматически). Оптические свойства растворителя и белка используются при определении скорости седиментации; которую выражают через константу седиментации s , зависящую как от массы, так и от формы белковой частицы:

$$S = \frac{v}{\omega^2 \cdot r},$$

где v – скорость перемещения границы растворитель-белок, см/с; ω – угловая скорость ротора, рад/с; r – расстояние от центра ротора до середины ячейки с раствором белка, см. Константа седиментации имеет размерность времени (ее выражают в секундах). Величина константы седиментации, равная $1 \cdot 10^{-13}$ с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S). Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.

Для вычисления молекулярной массы, помимо константы седиментации, необходимы дополнительные сведения о плотности растворителя и белка и другие согласно уравнению Сведберга:

$$M = \frac{RTS}{D(1 - v\rho)}$$

где R – газовая постоянная, эрг/(моль·гр.); T – абсолютная температура (по шкале Кельвина); S – константа седиментации; ρ – плотность растворителя; v – парциальный удельный объем молекулы белка; D – коэффициент диффузии.

Определение молекулярной массы белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и дорогостоящей аппаратуры. Поэтому в последние годы разработаны простые методы (гель-хроматография и электрофорез).

Гель-хроматографию проводят при заполнении колонки пористым гелем сефадекса. Через колонку пропускают ряд белков с известной молекулярной массой и строят график зависимости логарифма молекулярной массы от значений их элюционных объемов. Между логарифмом молекулярной массы белка, имеющего сферическую форму, и элюционным объемом существует прямая зависимость. Легко определить молекулярную массу исследуемого белка, зная его объем элюции.

Второй разновидностью этого метода является тонкослойная гель-хроматография. Длина пробега белка через тонкий слой сефадекса находится в логарифмической зависимости от его молекулярной массы ([рис.7.1](#)).

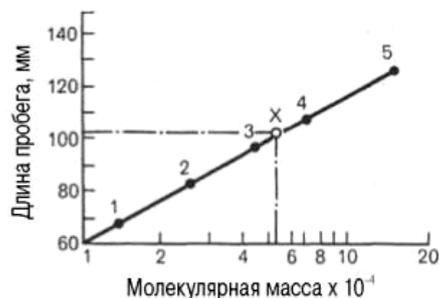


Рис. 7.1. Зависимость между длиной пробега белковых частиц при гель-хроматографии в тонком слое сефадекса G-150 и их молекулярными массами

При использовании диск-электрофореза в полиакриламидном геле строят график зависимости между логарифмом молекулярной массы калибровочных белков и подвижностью белковых частиц в полиакриламидном геле, а затем, определив подвижность исследуемого белка, по графику находят его массу (рис.7.2).

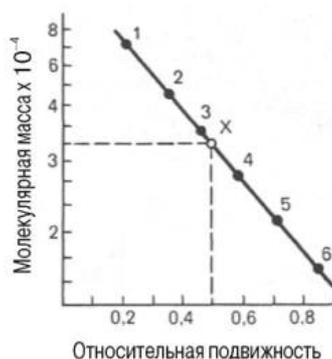
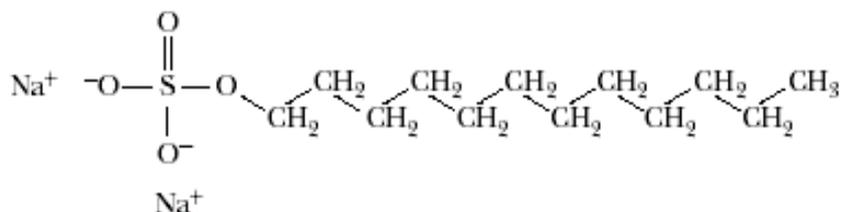


Рис. 7.2. Зависимость между молекулярной массой и относительной подвижностью белка при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле. присутствии додецилсульфата натрия

Электрофорез проводят в присутствии детергента – додецилсульфата натрия (SDS), т.к. только в этом случае наблюдается прямая пропорциональная зависимость между логарифмом молекулярной массы и подвижностью белков.



Додецилсульфат натрия

Денатурация белков

Природные белки имеют определенную, строго заданную пространственную конфигурацию и характерные физико-химические и биологические свойства при физиологических значениях температуры и pH среды. Под влиянием различных физических и химических факторов белки подвергаются свертыванию и выпадают в осадок, теряя нативные свойства, т.е. денатурируют. *Денатурация* — нарушение уникальной структуры нативной молекулы белка, ее третичной структуры, приводящее к потере характерных свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность и т.д.) (рис.7.3). Большинство белков денатурирует уже при нагревании их растворов выше 50–60°C.

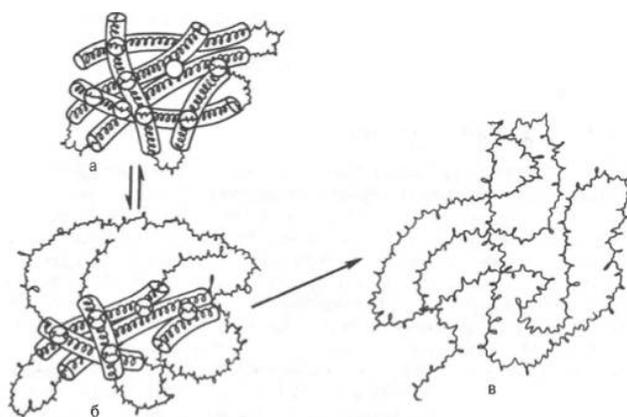


Рис. 7.3. Денатурация белка: а) нативный белок; б) стадия обратимой денатурации; в) стадия необратимой денатурации

При денатурации происходит потеря растворимости белка, особенно в изоэлектрической точке, повышение вязкости белковых растворов, увеличение количества свободных функциональных SH-групп и изменение характера рассеивания рентгеновских лучей. Характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической, антигенной или гормональной). При денатурации белка разрушаются в основном нековалентные связи (в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи). Дисульфидные связи в присутствии восстанавливающего агента меркаптоэтанола разрываются, в то время как пептидные связи самого остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры.

Денатурация белков с потерей биологической активности может происходить под действием высокой температуры, ультрафиолетового излучения, кислот, щелочей, ионов тяжелых металлов. Денатурация бывает обратимой (ренатурация) и необратимой.

Лекция 8

Классификация белков. простые и сложные белки

Принципы классификации белков

В основу классификации белков положена их структурная организация. Наиболее полная классификация структур белков представлена в компьютерных классификаторах «Dali/FASS», сделанных Л. Холмом и К. Сандером; в классификаторах, сделанных в группе Дж. Торнтон «CATH» (Class-Architecture-Topology—Homology) и в классификаторе «SCOP» (Structural Classification of Proteins), созданном А.Г. Мурзиным.

Классификация относится к строению доменов (компактных глобул), существующих либо сами по себе, либо в составе многодоменного белка. Она начинается со структурного класса домена (α , β и т.д.). Классы подразделяются по архитектурным типам каркаса, сложенного из α - и/или β -участков; архитектуры подразделяются по топологиям прохождения цепи через каркас, т.е. по мотивам укладки цепи.

И уже далее мотивы подразделяются на суперсемейства, где просматривается хоть какая-то гомология (след общего происхождения) последовательностей, суперсемейства – на семейства с явно проявляющейся гомологией, и т.д. вплоть до отдельных белков конкретных организмов.

Физическая классификация белковых структур (класс-архитектура-топология) дает возможность не только систематизировать уже изученные структуры, но и предсказывать будущие открытия белковых структур. Так, долгое время были известны только такие β -белки, которые сложены из антипараллельной β -структуры, а на месте β -белков, сложенных из параллельной β -структуры зияла лакуна, но потом она заполнилась.

По химическому составу все белки делят на *простые*, состоящие только из аминокислотных остатков, и *сложные*. Сложные могут включать ионы металла (металлопротеины) или пигмент (хромопротеины), образовывать прочные комплексы с липидами (липопротеины), нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеины), а также ковалентно связывать остаток фосфорной кислоты (фосфопротеины), углевода (гликопротеины).

Простые белки подразделяют на *фибриллярные*, *растворимые* в воде (актин, миозин) и *нерастворимые* (кератин, эластин, коллаген), и *глобулярные* (альбумины, глобулины, протамины, гистоны, проламины).

Фибриллярные белки

Коллагены, *эластин*, *кератин* относятся к нерастворимым фибриллярным белкам, которые составляют наружный покров тела животного и находятся в скелете и в соединительной ткани.

Коллагены широко распространены в живых организмах. Из них состоит соединительная ткань; они находятся в хрящах. Кости позвоночных жи-

вотных состоят из неорганических веществ (фосфорнокислого и углекислого кальция), жира и коллагенов. При кипячении с водой или действии перегретого водяного пара коллагены образуют клей. Если из костей извлечь жир и потом, обработав их кислотой, растворить фосфорнокислый кальций, останется белковое вещество – оссеин. При обработке оссеина перегретым водяным паром он переходит в клей. Чистый костяной клей называется желатиной. Особенно чистая желатина получается из рыбьего пузыря кипячением с водой.

Типичная молекула коллагена состоит из трех полипептидных цепей разных типов (α -спиралей), скрученных в виде правой *тройной спирали*. Полипептидные цепи построены из часто повторяющихся фрагментов, имеющих характерную последовательность: $-Gly-X-Y-$. Каждым третьим аминокислотным остатком является *глицин*. Часто встречаются остатки *пролина* и *4-гидроксипролина*. Молекула коллагена содержит остатки *3-гидроксипролина* и *5-гидроксилизина*. Присутствие в полипептидной цепи остатков гидроксиаминокислот является характерной особенностью коллагена. На одном из концов молекула коллагена сшита поперечными связями, образованными боковыми цепями остатков лизина. Количество поперечных связей возрастает по мере старения организма. Известны 12 вариантов коллагена, характеризующихся различным сочетанием полипептидных α -цепей. Молекулы коллагенов обладают свойством спонтанно агрегировать с образованием более сложных структур, микрофибрилл и фибрилл. Большинство коллагенов образуют *фибриллы цилиндрической формы* диаметром 20-500 нм с характерными поперечными полосами, повторяющимися через каждые 64-67 нм.

Эластин – основной белковый компонент, из которого состоят эластические волокна. Общим для коллагена и эластина является большое количество пролина и глицина, небольшое – метионина, отсутствие триптофана и цистеина. В отличие от коллагена в эластине много валина и аланина и меньше глутаминовой кислоты и аргинина. В целом, эластин характеризуется слишком малым количеством полярных аминокислотных остатков. Эластин входит в состав жил и других эластичных веществ соединительной ткани. Нити сырого шелка состоят из белкового вещества (фиброина), покрытого другим белковым веществом, играющим роль шелкового клея (серицином). При кипячении с водой шелк освобождается от клея, который при этом переходит в раствор.

Кератин является главной составной частью волос, рогов, копыт, ногтей, перьев и верхнего слоя кожи. Скорлупа куриного яйца состоит из известки и кератина. Если растворить известку скорлупы яйца в кислоте, останется мягкая кожа, состоящая из кератина; из кератина состоит кожа, которая следует за скорлупой яйца. По химическому составу кератин богат серой.

Глобулярные белки

Альбумины растворимы в воде, свёртываются при нагревании, нейтральны, сравнительно трудно осаждаются растворами солей. Примерами их могут служить альбумин белка куриного яйца, альбумин кровяной сыворотки, альбумин мышечной ткани, молочный альбумин. Поддерживают онкотическое давление плазмы крови, выполняют транспортные функции.

Глобулины нерастворимы в воде, но растворяются в очень слабых растворах солей. Более концентрированными растворами солей они вновь осаждаются; осаждение происходит при меньшей концентрации, чем та, которая необходима для осаждения альбуминов. Эти белки являются очень слабыми кислотами. Примерами глобулинов могут служить: фибриноген, глобулин кровяной сыворотки, глобулин мышечной ткани, глобулин белка куриного яйца. Выполняют транспортную и защитную функцию.

Гистоны □ белки основного характера. Находятся в составе нуклеопротеинов. В их состав входят лизин и аргинин, содержание которых не превышает 20-30%. Играют важную роль в регуляции экспрессии генов.

Протамины не содержат серы, обладают сравнительно сильными основными свойствами, обусловленными наличием в их составе аргинина (60-85%). Протамины хорошо растворимы в воде, изоэлектрическая точка их лежит в щелочной среде, образуют кристаллические соли, содержатся (в виде нуклеопротеинов) в сперматозоидах рыб. Имеют небольшую молекулярную массу (до 5000).

Проламины и глютелины находятся в зернах различных хлебных злаков. Растворяются в 80%-ном этиловом спирте, в то время как остальные белки в этих условиях выпадают в осадок. Представителем этих белков может служить глиадин, составляющий главную часть клейковины.

Сложные белки

Сложные белки – белки, содержащие прочно связанную небелковую часть молекулы, называемую простетической группой. В зависимости от природы простетической группы сложные белки подразделяются на ряд классов:

- 1) липопротеины (хиломикроны, липопротеины разной плотности);
- 2) гликопротеины (содержат остатки сахаров, масса белковой части превышает массу углеводной части);
- 3) протеогликаны (полисахариды, содержащие полипептидные участки);
- 4) фосфопротеины (казеин);
- 5) металлопротеины (ферритин);
- 6) хромопротеины (гемоглобин, цитохромы, миоглобин);
- 7) нуклеопротеины.

Лipoppоrеины

Представляют собой комплекс белков с жирами (рис.8.1). Разные фракции липопротеинов в сыворотке осуществляют транспорт жиров в организме. Кроме того, липопротеины могут входить в состав клеточных мембран, внутриклеточных образований, оболочек нервов.

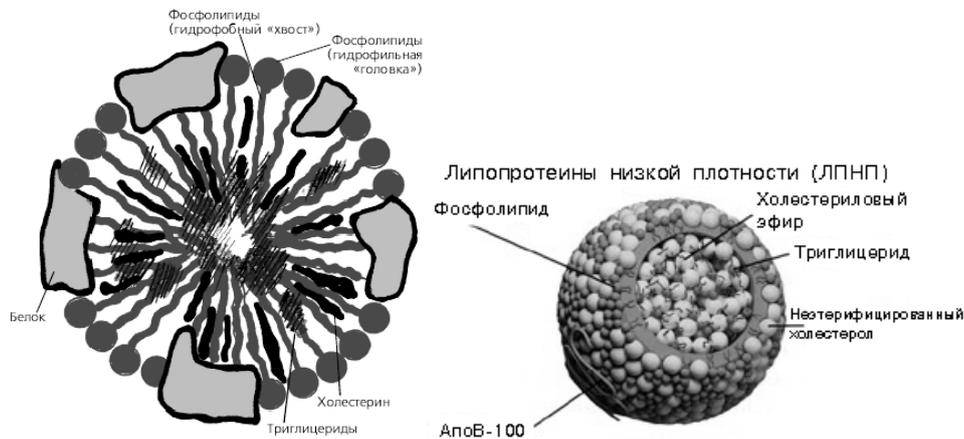


Рис. 8.1. Структура липопротеинов низкой плотности

Гликопротеины

В состав гликопротеинов входят углеводные компоненты □ гетерополисахаридные цепи, содержащие от двух до десяти, реже 15 мономерных остатков гексоз (галактоза и манноза, реже глюкоза), пентоз (ксилоза, арабиноза) и конечный углевод, чаще всего представленный N-ацетилгалактозамином, L-фукозой или сиаловой кислотой. В отличие от протеогликанов гликопротеины не содержат уоновых кислот и серной кислоты.

Некоторые белки этой группы встречаются в слизистых соединениях животных организмов и обуславливают свойства этих выделений тянуться в нити даже при сравнительно большом разбавлении. Эти белки образуются в подчелюстной железе (подчелюстная железа □ одна из слюнных желез), печени, железах желудка и кишечника. Другие гликопротеины находятся в хрящах, яичном белке, стекловидном теле глаза и т.д. К типичным гликопротеинам относят большинство белковых гормонов, мембранные сложные белки, все антитела (иммуноглобулины), белки плазмы крови, молока, овальбумин, интерфероны, факторы комплемента, группы крови, рецепторные белки и др.

Гликопротеины выполняют специфические функции: обеспечивают клеточную адгезию, молекулярное и клеточное узнавание, антигенную активность опухолевых клеток, оказывают защитное и гормональное, а также антивирусное действие (рис.8.2).

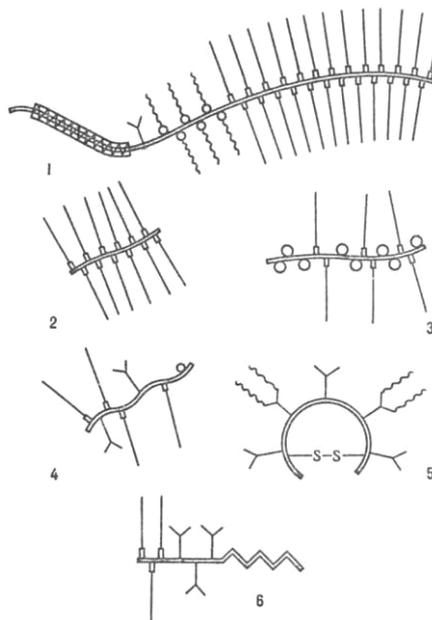


Рис.8.3. Схематическое изображение структур протеогликанов: 1 – протеогликан хряща, 2 – протеогепарин; 3 – протеодерматансульфат с олигосахаридами муцинового типа, 4 – протеохондроитинсульфат или протеодерматансульфат небольшой молекулярной массы, 5 – протеокератансульфат роговицы; 6 – протеогепарансульфат клеточной поверхности

Фосфопротеины

Содержат в своем составе фосфор, имеют определенно выраженный кислотный характер. Главным представителем фосфопротеинов является *казеин* молока. Он обладает настолько ясно выраженным кислотным характером, что разлагает углекислые соли с выделением углекислого газа. Казеин растворяется в слабых растворах щелочей, образуя с ними соли. Соли казеина называются казеинатами. При нагревании казеин не свертывается. При действии кислот на соли казеина он выделяется в свободном виде. Этим объясняется свертывание молока при прокисании. *Казеин* содержит фосфор в виде сложного эфира фосфорной кислоты. *Вителлин* находится в желтке куриного яйца.

Металлопротеины

В своем составе содержат ионы одного или нескольких металлов. Выполняют функцию транспорта и хранения металлов в организме (например, *ферритин*, в отличие от гемоглобина, участвует в транспорте и депонировании железа в организме). К металлопротеинам относится и ряд ферментов. Например, супероксиддисмутаза – Cu,Zn-СОД, в которой Zn выполняет структурную функцию, Cu – каталитическую.

Нуклеопротеины

Находятся в клеточных ядрах. Выполняют структурную и регуляторную функции. При осторожном гидролизе они расщепляются на белок и нуклеиновую кислоту (рис.8.4). Нуклеиновые кислоты являются весьма сложными веществами, расщепляющимися при гидролизе на фосфорную кислоту, углеводы и азотосодержащие органические вещества группы пиримидина и группы пурина.

В природе обнаружено 2 типа нуклеопротеинов, отличающихся друг от друга по составу, размерам и физико-химическим свойствам, : дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП).

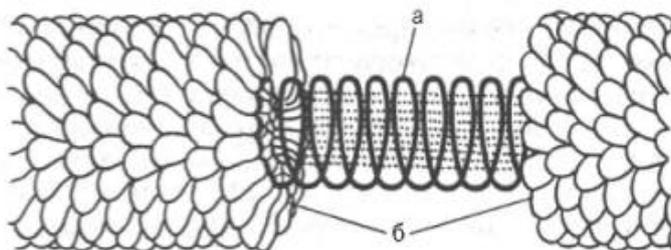


Рис. 8.4. Модель вируса мозаичной болезни табака, а □ спираль РНК; б □ субъединицы белка

Хромопротеины

Хромопротеины – белки, имеющие в качестве простетической группы окрашенное вещество. Из хромопротеинов наиболее изучены *гемоглобин, миоглобин, цитохромы, хлорофилл*.

Гемоглобин

Красящее вещество красных кровяных телец □ эритроцитов. Гемоглобин представляет собой соединение белка глобина с гемохромом (рис.8.5). Гемоглобин, соединяясь с кислородом, превращается в оксигемоглобин, который, отдавая свой кислород другим веществам, снова превращается в гемоглобин. Гемоглобин играет роль переносчика кислорода от легких к тканям. Образовавшийся в легких оксигемоглобин кровью разносится по телу и, отдавая свой кислород, способствует протеканию в организме окислительных процессов. Кроме того, гемоглобин вместе с плазмой крови осуществляет регуляцию величины рН крови и перенос углекислоты в организме.

Характерной особенностью гемоглобина является его способность соединяться с окисью углерода, после чего он теряет способность соединяться с кислородом. Этим объясняется ядовитое действие окиси углерода.

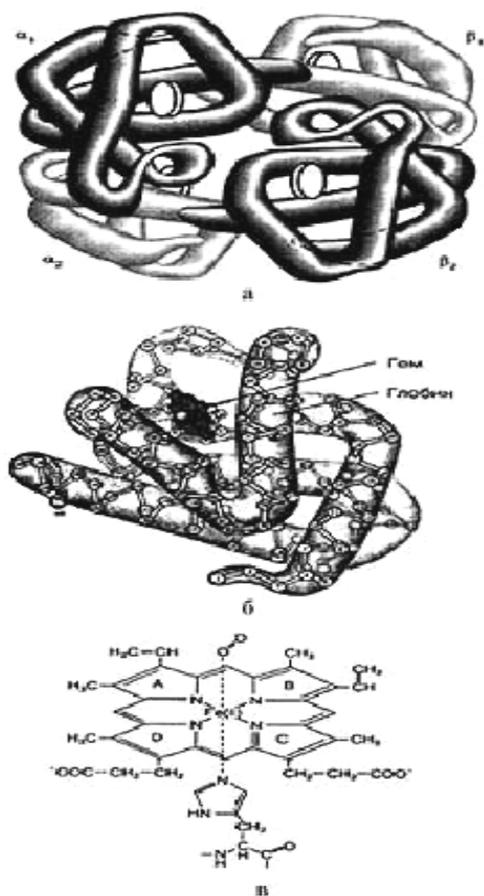


Рис.8.5. Гемоглобин: а – олигомер гемоглобина; б – субъединица гемоглобина; в – структура гема

Вне организма гемоглобин, при действии воздуха, превращается в метгемоглобин, который отличается от оксигемоглобина прочностью связи с кислородом. При обработке ледяной уксусной кислотой метгемоглобин расщепляется с образованием глобина и гематина. При обработке метгемоглобина тем же реактивом, но в присутствии NaCl, получается хлористая соль гематина, называемая геминном. Гемин образует характерные красно-коричневые ромбики, которые позволяют обнаружить присутствие крови в пятнах даже через несколько лет. Гематин очень близок гемохромогену, но все же отличается от него.

Белковая структура гемоглобина более сложна. Гемоглобин млекопитающих (в том числе человека) имеет молекулярную массу 64500 Да и состоит из четырех полипептидных цепей, каждая из которых содержит свой собственный гем. Преобладающая форма гемоглобина у взрослых людей – гемоглобин А – имеет две пары полипептидных цепей (α -цепей, каждая из которых состоит из 141 аминокислотного остатка, и β -цепей – по 146 остатков в каждой). Несмотря на то, что аминокислотные последовательности полипептидных цепей гемоглобина и миоглобина в значительной степени различаются; – трехмерные структуры их сходны и гемы в молекулах того и другого занимают гидрофобные полости внутри свернутых полипептидных цепей.

Четыре полипептидные цепи гемоглобина ассоциированы в тетраэдрическую структуру и образуют сферическую молекулу. Каждая из α -цепей контактирует с двумя β -цепями, в то время как между двумя α -цепями или между двумя β -цепями взаимодействие почти отсутствует. Каждый из четырех гемов гемоглобина способен присоединить одну молекулу кислорода. Кислородсодержащая форма гемоглобина называется *оксигемоглобином*, а форма, не содержащая кислорода, – *дезоксигемоглобином*. Когда дезоксигемоглобин поглощает кислород, в его трехмерной структуре происходит ряд изменений, главным образом перемещение атома Fe^{2+} в плоскость системы колец гема. Как и в случае миоглобина, окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} приводит к образованию неактивной формы гемоглобина □ метгемоглобина, который не способен присоединять молекулярный кислород.

Способность обратимо образовывать комплексы с кислородом обуславливает жизненно важную роль гемоглобина как переносчика кислорода у животных. Способность артериальной крови переносить кислород в присутствии гемоглобина в 70 раз выше, чем в его отсутствие.

Характерные особенности связывания кислорода гемоглобином:

1) кривая связывания □ освобождения кислорода гемоглобином имеет сигмовидную форму, что свидетельствует о том, что связывание кислорода гемом □ кооперативный процесс, т.е. связывание кислорода одним гемом облегчает его связывание другими гемами;

2) сродство гемоглобина к кислороду зависит от величины рН и содержания CO_2 ;

3) органические фосфаты, особенно 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), также оказывают влияние на сродство гемоглобина к кислороду.

Аллостерические свойства гемоглобина обусловлены взаимодействием четырех субъединиц его молекулы. При связывании кислорода происходит перемещение атома железа гема в плоскость гема оксигемоглобина, а проксимальный гистидин приближается к кольцу гема. Такое перемещение вызывает последующие небольшие изменения третичной структуры субъединицы, в частности, изменяется положение тирозинового остатка и смежной С-концевой аминокислоты. В результате исчезают некоторые взаимодействия между субъединицами и четвертичная структура дестабилизируется. При этом изменяется конформация других субъединиц, что облегчает связывание ими кислорода. И, наоборот, освобождение кислорода одним из гемов приводит к изменениям конформации и взаимодействия между субъединицами, что облегчает освобождение кислорода другими гемами.

С понижением значения рН освобождение O_2 гемоглобином упрощается. То же самое происходит при повышении концентрации CO_2 . Это важно с физиологической точки зрения, т.к. в тканях с быстро протекающим обменом веществ образуется много CO_2 и кислот. Высокие уровни CO_2 и H^+ стимулируют освобождение O_2 из гемоглобина, и таким образом удовлетворяется потребность в большом количестве кислорода. После освобождения кислорода дезоксигемоглобин присоединяет H^+ и CO_2 . Для альвеолярных капилляров

легких характерна высокая концентрация кислорода, и там по мере связывания кислорода дезоксигемоглобином происходит освобождение H^+ и CO_2 .

Структурные превращения, которые претерпевает молекула гемоглобина, были подробно изучены. При переходе от оксигемоглобина к дезоксигемоглобину в результате конформационных изменений карбоксилсодержащие аминокислотные остатки приближаются к некоторым гистидиновым остаткам и концевым NH_2 -группам. С изменением локального заряда микроокружения повышается величина pK кислого остатка и таким образом возрастает его сродство к HCO_3^- , которая значительно легче связывается с дезоксигемоглобином, чем с оксигемоглобином. Она связывается с концевой NH_2 -группой каждой цепи с образованием карбаминопроизводных.

У человека 2,3-дифосфоглицерат снижает сродство гемоглобина к кислороду в 26 раз. Это важно с физиологической точки зрения, поскольку в отсутствие этого механизма гемоглобину было бы трудно освободить много кислорода в капиллярах тканей. Такое действие 2,3-дифосфоглицерата обусловлено его способностью связываться с дезоксигемоглобином, а не с оксигемоглобином. 2,3-ДФГ связывается с гемоглобиновым тетрамером, располагаясь в центральном пространстве, в непосредственной близости от всех четырех субъединиц. Связывание 2,3-дифосфоглицерата и O_2 – взаимоисключающие процессы. В ходе оксигенации конформационные изменения приводят к значительному уменьшению центрального пространства в гемоглобиновом тетрамере и молекула 2,3-дифосфоглицерата вытесняется. При этом необходимо нарушение 2,3-дифосфоглицерат-белкового взаимодействия, что затрудняет связывание кислорода гемоглобином. Для поглощения 2,3-дифосфоглицерата требуется расщепление связи гемоглобин- O_2 , так что 2,3-дифосфоглицерат упрощает высвобождение кислорода.

Сродство гемоглобина к окиси углерода больше, чем к кислороду; следовательно, CO может вытеснять кислород из оксигемоглобина. Образующийся карбоксигемоглобин не способен служить переносчиком кислорода, и поэтому окись углерода является весьма эффективным ядом. Карбоксигемоглобин имеет вишневокрасную окраску, характерную для цвета лица людей, отравившихся окисью углерода, что позволяет легко диагностировать отравление. Функционирование гемоглобина могут серьезно нарушать различные лекарственные препараты. Продукты метаболизма ацетанилида, фенацетина и некоторых других индуцируют окисление гемоглобина до Fe^{3+} -формы, приводя к серьезному снижению кислородпереносящей способности крови.

Так же, как и у большинства других животных, у человека на разных стадиях развития организма имеются различные типы гемоглобина в крови. Гемоглобин плода и гемоглобин взрослого человека различаются по спектрам поглощения света и электрофоретическим свойствам. В крови зародыша на ранних стадиях его развития присутствует гемоглобин третьего типа. Зародышевый гемоглобин F обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин A взрослых людей. Благодаря этому возможен оптимальный перенос кислорода от гемоглобина A матери к гемоглобину F плода. Более

высокое сродство гемоглобина F к кислороду подтверждается также тем, что он связывает 2,3-дифосфоглицерат менее прочно, чем гемоглобин A.

Существует много генетических вариаций человеческого гемоглобина. Наиболее известная из них найдена при «серповидно-клеточной анемии» – мутации одного гена, которая в гомозиготном состоянии вызывает деформацию эритроцитов с образованием клеток, имеющих форму серпа. Гемоглобин S серповидных клеток отличается от нормального гемоглобина одним аминокислотным остатком в β -цепях. В нем происходит замена полярной глутаминовой кислоты на неполярную аминокислоту валин, что приводит к очень сильному снижению растворимости дезоксигемоглобина S, хотя растворимость оксигемоглобина при этом остается нормальной. Дезоксигемоглобин S образует волокнистый осадок, который вызывает деформацию и разрушение эритроцитов и, как следствие, – хроническую гемолитическую анемию.

В настоящее время известны более 100 мутантных гемоглобинов. Некоторые из замен являются безвредными «поверхностными» заменами, тогда как другие, затрагивающие кислородсвязывающие участки, третичную структуру или взаимодействия субъединиц в четвертичной структуре (что сказывается на аллостерических эффектах), могут очень сильно влиять на связывание кислорода.

Миоглобин

Второй важный белок (миоглобин), транспортирующий кислород и углекислый газ находится непосредственно в клетках. Миоглобин – небольшой глобулярный белок (молекулярная масса 16500 Да); молекула его состоит из одной полипептидной цепи (153 аминокислотных остатка) и одного гема (рис.8.6). Сродство к кислороду у миоглобина значительно больше, чем у гемоглобина, поэтому миоглобин может принимать кислород от гемоглобина для использования или сохранения его в мышечных клетках. Подобно гемоглобину он образует оксимиоглобин, карбокси- и метмиоглобин.

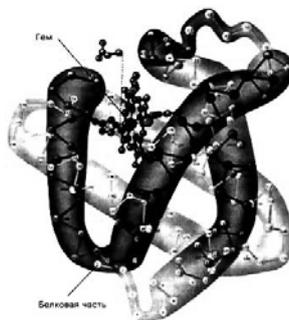


Рис.8.6. Миоглобин

Цитохромы электронтранспортной цепи

Цитохромы представляют собой группу небольших гемопротеинов, у которых в отличие от гемоглобина и миоглобина, атом железа, входящий в

состав их гема, легко подвергается обратимому окислению и восстановлению. Это свойство придает им чрезвычайно важное биологическое значение при переносе электронов. Цитохромы содержатся во всех животных, растениях и аэробных микроорганизмах. На основании природы простетической группы и способа ее связи с белками цитохромы можно разделить на четыре главные группы: *a*, *b*, *c* и *d*.

Хлорофиллы

Хлорофиллы, связанные с белками (от гр. Chloros □ зелёноватый + phyllon □ лист), □ зелёные пигменты растений. Основу молекулы хлорофилла составляет магний-порфириновый комплекс, окружённый заместителями – фитолом, придающим молекуле хлорофилла способность встраиваться в липидный слой мембраны клетки. Существует несколько типов хлорофиллов, отличающихся системой сопряжённых связей и заместителями. Высшие растения и водоросли в качестве основного пигмента содержат хлорофилл *a*, в качестве сопровождающих дополнительных □ хлорофилл *b* (высшие растения и зелёные водоросли), хлорофилл *c* (бурые и диатомовые водоросли), хлорофилл *d* (красные водоросли).

Флавопротеины

Флавопротеины содержат прочно связанные с белком простетические группы, представленные изоаллоксазиновыми производными – окисленными флавинмононуклеотидами (FMN) и флавинадениндинуклеотидами (FAD). Флавопротеины входят в состав оксидоредуктаз. Некоторые флавопротеины содержат ионы металлов. Представителями флавопротеинов, содержащими также негемовое железо, являются ксантиноксидаза, сукцинатдегидрогеназа.

Лекция 9 Сложные белки

Гликопротеины

Гликопротеины составляют большую группу сложных белков, содержащих в качестве простетической части углеводы и/или их производные, ковалентно-связанные с белком. При гидролизе гликопротеинов в углеводном компоненте обнаруживаются такие моносахариды, как D-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин и др.

Небольшие олигосахаридные группы могут присоединяться к белкам через O-гликозидную связь к гидроксилам остатков серина и треонина (рис. 9.1).

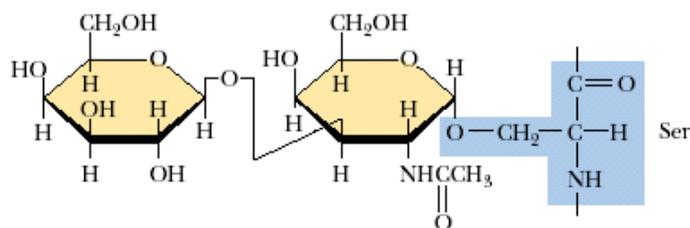


Рис. 9.1. О-гликозидная связь в гликопротеинах

В ряде белков встречаются N-гликозидные связи с амидными группами Asn, реже Gln или NH_2 группами Lys и Arg (рис.9.2).

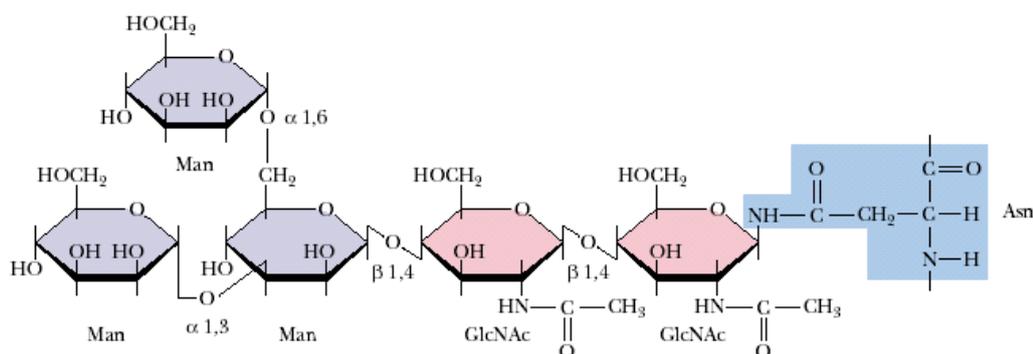
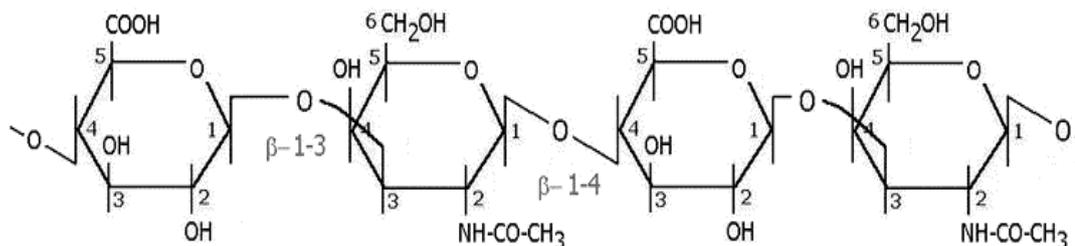


Рис. 9.2. N-гликозидная связь в гликопротеинах

По соотношению белковой и углеводной частей гликопротеины подразделяются на нейтральные и кислые. В нейтральных гликопротеинах углеводная часть может составлять от 3% до 15%, а у некоторых гликопротеинов 40%. К нейтральным гликопротеинам относятся яичный белок (овальбумин), гликопротеины плазмы крови (трансферрин, церуллоплазмин), белок щитовидной железы (тиреоглобулин).

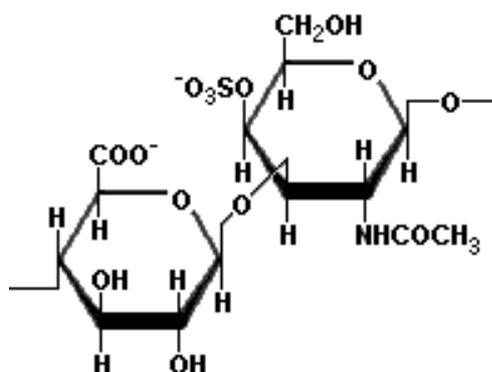
В состав кислых гликопротеинов помимо amino и моносахаров входит уоновая кислота, которая имеет большое биологическое значение, принимая участие в обезвреживании билирубина и ряда ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств. Важнейшими кислыми гликопротеинами являются гликопротеины, содержащие в составе гиалуроновые кислоты. Повторяющейся структурной единицей гиалуроновой кислоты служит дисахарид, состоящий из ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, соединенных $\beta(1 \rightarrow 3)$ -гликозидной связью:

ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА



Отдельные дисахаридные остатки соединяются в цепь $\beta(1\rightarrow4)$ -глюкозидными связями. В глюкуроновой кислоте карбоксильная группа находится в ионизированном состоянии, поэтому гиалуроновая кислота является чрезвычайно гидрофильным соединением, удерживающим большое количество воды. Её растворы обладают высокой вязкостью.

Важным углеводным компонентом гликопротеинов является также хондроитинсерная кислота или хондроитинсульфат-полимер, состоящий из ацетилгалактозамина, этерифицированного серной кислотой и глюкуроновой кислоты. Ацетилгалактозамин и глюкуроновая кислота соединяются между собой $\beta(1\rightarrow3)$ глюкозидной связью:



хондроитин -4-сульфат

Хондроитинсульфаты составляют целые семейства (А, В, С), содержащиеся в качестве компонентов соединительной ткани. Их структуры различаются по положению сульфатных остатков, соотношению глюкуроновой кислоты, N-ацетил-D-галактозамина и сульфата. В хрящевой ткани хондроитинсульфаты связываются с особым белком в виде хондромукоида; в костной ткани образуют осцеумукоид. Хондроитинсульфаты относятся к мукополисахаридам с молекулярной массой в пределах от 50 до 100 кДа.

Муцины – мукополисахариды, полужидкие слизеобразные вещества, вырабатываемые пищеварительными железами, которые в комплексе с особыми белками играют важную роль в предохранении стенок пищеварительного тракта от механических, химических повреждений и самопереваривания. В состав мукоитинсульфата входит дисахаридный остаток, построенный

из маннозамина и глюкуроновой кислоты, причем маннозамин этерифицирован двумя, тремя остатками серной кислоты.

Из природных источников животного и растительного происхождения выделены различные гликопротеины, выполняющие разнообразные функции: защитные (антитела, иммуноглобулины); регуляторные (фолликулостимулирующий, соматотропный гормоны); транспортные (трансферрин, церулоплазмин, тиреоглобулин); гомеостатические (гепарин); структурные (гликофорин, муреин); образующие рецепторы и др.

Особую группу гликопротеинов составляют протеоглики, в составе которых углеводный компонент преобладает и на его долю приходится от 80% и выше. Более того, эти вещества по своим свойствам более сходны с полисахаридами, чем с белками. Все они содержат глюкозамины или галактозамины.

В межклеточном матриксе содержатся крупные протеоглики – агрекан и версикан. Кроме них в межклеточном веществе имеется целый набор так называемых малых протеогликанов. Агрекан – основной протеогликан хрящевого матрикса, составляющего 10% исходной ткани и 25% сухого хрящевого матрикса. Это очень крупная молекула, в которой к одной полипептидной цепи присоединены до 100 цепей хондроитинсульфатов и около 30 цепей кератинсульфатов. По форме молекула агрекана напоминает «ершик для мытья бутылок». В хрящевой ткани молекулы агрекана собираются в агрегаты с гиалуроновой кислотой и небольшим связывающим белком.

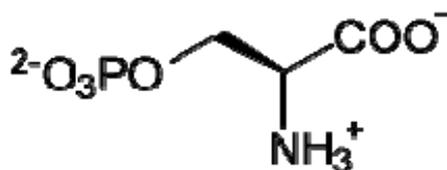
Оба компонента присоединяются к агрекану нековалентными связями в области определенного домена, взаимодействующего примерно с пятью дисахаридными единицами гиалуроновой кислоты. Далее этот комплекс стабилизируется связывающим белком.

Малые протеоглики – протеоглики с низкой молекулярной массой. Они содержатся в хрящах, сухожилиях, связках, менисках, коже и других видах соединительной ткани, имеют небольшой коровый белок, к которому присоединены одна или более цепи гликозамингликанов. Наиболее изучены декорин, бигликан, фибромодулин, люмикан, перликан. Коровые белки бигликана и декорина похожи по размерам и структуре. Они имеют несколько tandemных повторов, богатых лейцином, которые образуют α -спирали и β -структуры. На N- и C-концах этих белков расположены домены, содержащие S-S-связи.

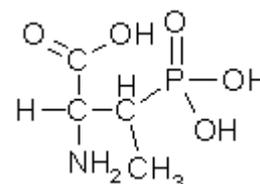
Малые протеоглики являются мультифункциональными макромолекулами. Они могут связываться с другими компонентами соединительной ткани и оказывать влияние на их строение и функции. Например, декорин и фибромодулин присоединяются к фибриллам коллагена второго типа и ограничивают их диаметр, препятствуя образованию толстых фибрилл. Присоединение декорина и бигликана к фибронектину подавляет клеточную адгезию, а присоединение фактора роста опухолей β снижает его митогенную активность. Малые протеоглики играют важную роль в развитии и регенерации соединительной ткани.

Фосфопротеины

Простетической группой *фосфопротеинов* является ортофосфорная кислота. Остатки фосфорной кислоты присоединяются к молекуле белка сложноэфирными связями по месту гидроксильных групп оксиаминокислот – серина и треонина. Чаще всего в фосфопротеинах преобладает именно соединения фосфорной кислоты с серином.



Остаток фосфосерина



Остаток фосфотреонина

В фосфопротеинах выявлены пиррофосфатные и фосфодиэфирные остатки, наличие которых указывает на то, что пептидные цепи могут быть соединены не только дисульфидными мостиками, но и остатками фосфорной кислоты.

С биологической точки зрения фосфопротеины являются питательными веществами необходимыми для растущего организма. Прежде всего фосфопротеины вместе с необходимым пулом аминокислот участвуют в формировании скелета. Типичными представителями этих сложных белков являются казеины, существующие в нескольких формах и различающиеся между собой по содержанию фосфата и аминокислотным составом. Несколько различных фосфопротеинов найдено среди белков яиц: овальбумин – фосфопротеин яичного белка, вителленин и фосвитин, выделенные из яичного желтка. Ихтулин, обнаруженный в икре рыб, играет немаловажную роль в развитии эмбриона рыб. Пепсин, являясь протеолитическим ферментом, относится к фосфопротеинам и содержит одну молекулу фосфорной кислоты на одну молекулу этого белка. Фосфатная группа присоединяется к радикалу серина, находящемуся в пептидной цепи рядом с глутаминовой кислотой. Фосфопротеинами являются также ферменты фосфоглюкомутаза и фосфоорилаза.

Липопротеины

Липопротеины – высокомолекулярные структуры, большинство из которых являются транспортной формой липидов. Липопротеины состоят из белков и липидов ([рис. 9.3](#)). В отличие от липидов, липопротеины растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях. Прочность связи белков с липидами в липопротеинах неодинакова и зависит от того, есть ли в

молекуле липида ионизированные группы атомов. Липопротеины широко представлены в плазме крови, нервной ткани, молоке, участвуют в построении плазматических мембран. Все типы липопротеинов имеют сходное строение: гидрофобное ядро и гидрофильный слой на поверхности. Гидрофильный слой образован белками, которые называют апопротеинами, и амфифильными молекулами липидов – фосфолипидов и холестерина. Гидрофильные группы этих молекул ориентированы в водную фазу, а гидрофобные части – к гидрофобному ядру липопротеина, в котором находятся транспортируемые липиды.

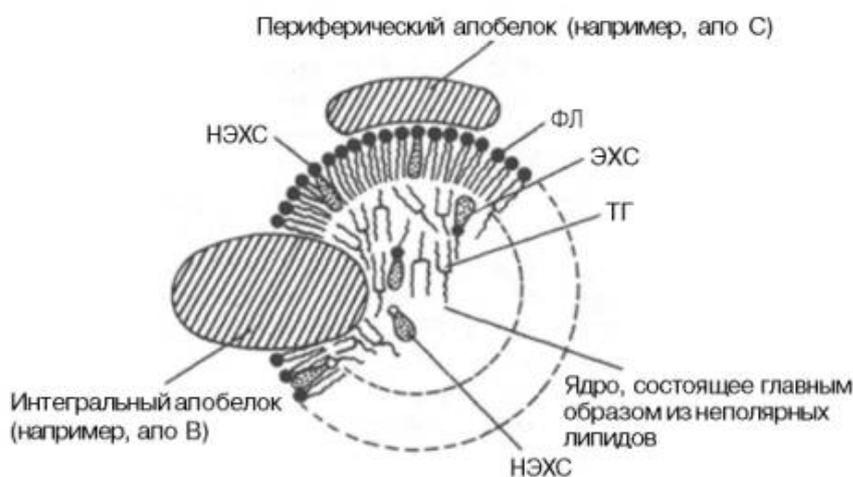


Рис. 9.3. Схема строения липопротеиновой частицы: НЭХС – неэтерифицированный (свободный) холестерин, ЭХС – этерифицированный холестерин, ТГ – триацилглицеролы, ФЛ – фосфолипиды

Некоторые апопротеины интегральны и не могут быть отделены от липопротеина, а другие могут свободно переноситься от одного типа липопротеина к другому. В липопротеинах апопротеины выполняют несколько функций: формируют структуру липопротеина; взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеток; определяют какими тканями будет захвачен липопротеин; служат ферментами или активаторами ферментов, действующих на липопротеин.

В организме синтезируются следующие липопротеины: хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП), см. [табл. 9.1](#).

Состав и некоторые характеристики липопротеинов плазмы крови

Типы ли- попротеи- нов	Хиломикро- ны	ЛПОНП	ЛППП	ЛПНП	ЛПВП
Белки, %	2	10	11	22	50
ФЛ, %	3	18	23	21	27
ХС, %	2	7	8	8	4
ЭХС, %	3	10	30	42	16
ТАГ, %	85	55	26	7	3
Функции	Транспорти- рование ли- пидов из клеток ки- шечника	Транспорти- рование ли- пидов, синтезируе- мых в пече- ни	Промежу- точная фор- ма превра- щения ЛПОНП в ЛПНП под действием фермента ЛП-липазы	Транспор- тирование холестери- на в ткани	Удаление избытка хо- лестерина из клеток и других ли- попротеинов
Место об- разования	Эпителий тонкого ки- шечника	Клетки печени	Кровь	Кровь	Клетки пече- ни, ЛПВП- предшест- венники
Плотность, г/мл	0,92-0,98	0,96-1,00	–	1,00-1,06	1,06-1,21
Диаметр частиц, нМ	Больше 120	30-100	–	21-100	7-15
Основные аполипо- протеины	В 48, С 2, Е	В-100, С 2, Е	В-100, Е	В-100	А-1, С-2, Е

Функции апопротеинов следующие: В-48 – основной белок хиломик-
ронов; В-100–основной белок ЛПОНП, ЛПНП, ЛППП, взаимодействующий с
рецепторами ЛПНП; С-2 – активатор ЛП-липазы, переносится с ЛПВП на
ХМ и ЛПОНП в крови; Е – взаимодействует с рецепторами ЛПНП; А – акти-
ватор фермента лецитин-холестеринтрансферазы (ЛХАТ).

Липопротеины хорошо растворимы в крови, не слипаются, т. к. имеют
небольшой размер и отрицательный заряд на поверхности. Некоторые липо-
протеины легко проникают через стенки капилляров кровеносных сосудов и
доставляют липиды к клеткам.

Хиломикроны, имеющие большие размеры, не могут преодолеть ка-
пилляры и поэтому сначала попадают в лимфатическую систему, а потом че-
рез главный грудной проток вливаются в кровь вместе с лимфой.

Металлопротеины

Сложные белки могут в качестве небелковой части могут содержать

металлы (такие, как медь, железо, магний, цинк, селен и др.). Объединение белковой части с металлом, как правило, происходит посредством кооплексионной связи, без каких-либо специальных группировок атомов. К числу металлопротеинов относятся около сотни ферментов, например, полифенолоксидаза, цитохромоксидаза (содержат Cu), карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа, карбоксипептидаза, ДНК-и РНК-полимеразы (содержат Zn), цитохромы, каталаза, пероксидаза содержат Fe. Важная функция металлопротеинов связана с транспортированием металлов и/или их накоплением. К транспортным белкам относится металлопротеин трансферрин. Он синтезируется в печени и способен связывать только окисленное железо. Поступающее в кровь железо окисляется с помощью феррооксидазы, являющейся медь-содержащим белком плазмы крови церулоплазмином. Одна молекула трансферрина может связать один или два иона Fe, но одновременно с анионом CO с образованием комплекса трансферрин-2. В норме трансферрин крови насыщен железом примерно на 33%.

Ферритин – олигомерный белок, состоящий из тяжелых и легких полипептидных цепей, составляющих 24 протомера. Это пример металлопротеина, депонирующего железо. Ферритин может находиться в нескольких изоформах в зависимости от разного набора протомеров. По своей архитектуре ферритин – полая сфера, внутри которой может содержаться от 3000 до 45000 ионов трехвалентного железа. Тяжелые цепи ферритина окисляют двухвалентное железо с образованием трехвалентного. Ферритин содержится почти во всех тканях, но в наибольшем количестве в печени, селезенке и костном мозге.

Инсулин – гормон, вырабатываемый β-клетками поджелудочной железы и синтезирующийся в виде неактивного предшественника – препроинсулина, в ходе последовательного протеолиза в конечном итоге расщепляется до инсулина и С-пептида. Инсулин и С-пептиды в эквимольных количествах включаются в секреторные гранулы. В гранулах инсулин соединяется с цинком, образуя димеры и гексамеры (рис. 9.4).

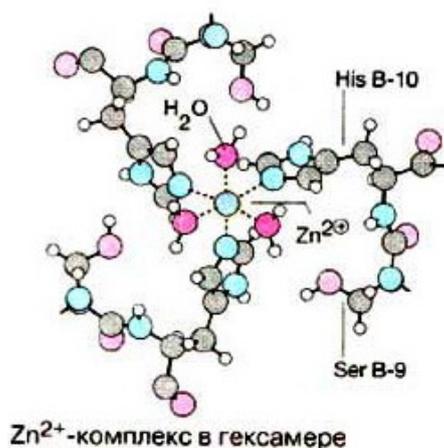


Рис. 9.4. Гексамерный комплекс инсулина с Zn^{2+}

Особое внимание необходимо уделить железо-серным белкам, содержащим негемовое железо. FeS-белки входят в состав электроннотранспортной цепи в комплекс I (содержащим кроме FMN не менее пяти железо-серных белков) и комплекс III, включающий один FeS-белок, цитохром *c*₁ и две разные формы цитохрома *b*.

Атомы железа в FeS-белках собраны в несколько групп, т.н. железо-серных центров. Известны 3 типа FeS-центров – FeS, Fe₂S₂, Fe₄S₄, в которых атом железа связан с атомом серы остатков цистеина или неорганической серы (рис.9.5).



Рис.9.5. Железо-серные центры ферритина: Fe₂S₂-центр (слева), Fe₄S₄-центр (справа)

FeS-центр – атом железа связан координационными связями с четырьмя атомами серы, принадлежащими четырем остаткам цистеина в белке; Fe₂S-центр □ каждый из двух атомов железа связан координационными связями с двумя атомами неорганической серы и двумя остатками цистеина в белке; Fe₄S₄-центр □ (четыре атома железа), каждый из четырёх атомов железа связан с четырьмя атомами серы и четырьмя остатками цистеина в белке.

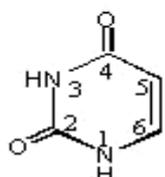
Лекция 10

Строение, свойства, биологическая роль нуклеотидов

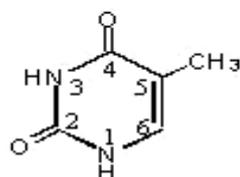
Нуклеотиды – органические вещества, состоящие из гетероциклического азотистого основания, моносахарида (пентозы) и остатка фосфорной кислоты. Азотистые основания представлены в природных нуклеотидах двумя типами: пуриновые, например аденин (6-аминопурин – А), гуанин (2-амино,6-оксопурин – G), пиримидиновые, например цитозин (2-окси-4-аминопиримидин – С), тимин (5-метил-2,4-диоксопиримидин – Т) и урацил (2,4-диоксопиримидин – U).

АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ

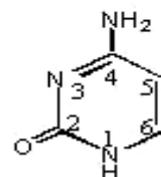
ПИРИМИДИНОВЫЕ



Урацил
U

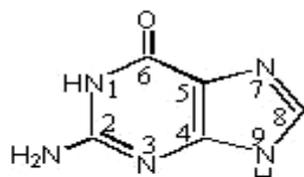


Тимин
T

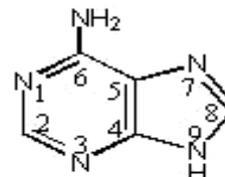


Цитозин
C

ПУРИНОВЫЕ

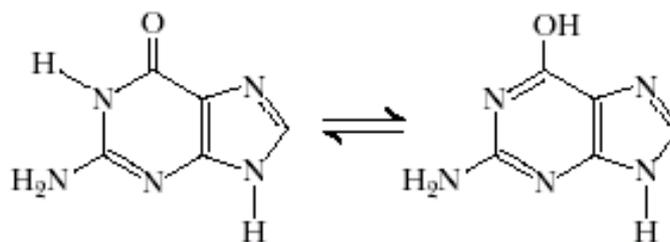


Гуанин
G



Аденин
A

Все оксопроизводные азотистых оснований могут существовать в лактимной (енольной) и лактамной (кетонной) форме. При физиологических значениях pH превалирует лактамная форма.

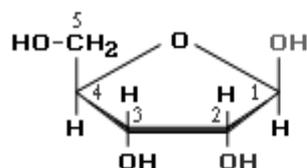


Кетонная форма

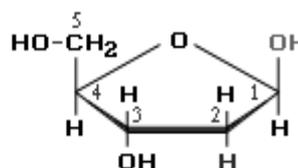
Енольная форма

Азотистые основания поглощают в УФ области спектра с максимумом при 260 нм. Это свойство используется для количественного определения нуклеиновых кислот.

Пентозами в нуклеотидах являются рибоза или дезоксирибоза:



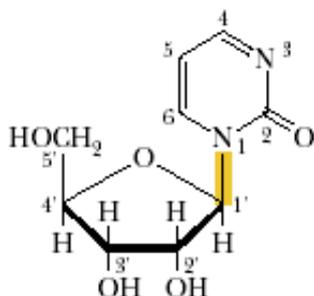
β-D-рибофураноза



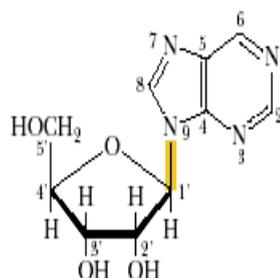
β-D-2-деоксирибофураноза

Гетероциклические основания, связываясь с углеводным компонентом, образуют нуклеозид. Пентоза соединяется с азотистым основанием N-

гликозидной связью, которая образуется между C_{1'}-атомом пентозы и N₁-атомом пириимидина или N₉-атомом пурина. Методами периодатного окисления, спектрального и рентгеноструктурного анализов было доказано, что природные нуклеозиды имеют β-конформацию гликозидной связи.



β-N₁-гликозидная связь

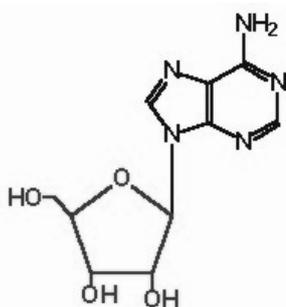


β-N₉-гликозидная связь

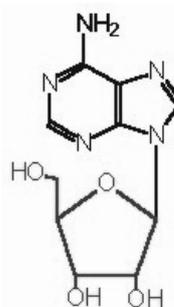
Название нуклеозидов составляют, исходя из названия азотистого основания, меняя окончание у пуринов на \square озин, у пириимидинов – на –дин. Например, если аденин присоединяется к рибозе, образуется нуклеозид аденозин; если урацил – уридин.

Все пять гетероциклических оснований имеют плоскую конформацию. В то же время для остатков рибозы и дезоксирибозы плоская конформация энергетически невыгодна. В природе реализуются только две конформации пентоз: либо C₂-эндо-, либо C₃-эндоконформация. При этом нуклеотидная единица с 3'-эндоконформацией углеводного остатка имеет меньшую длину, чем 2'-эндоизомер. В свободных нуклеотидах переходы от C₂-эндоконформации к C₃-эндоконформации и от синконформации – к антиконформации легки.

Важнейшей характеристикой при определении конформации нуклеозида имеет взаимное расположение углеводной и гетероциклической частей, которое определяется углом вращения вокруг N-гликозидной связи. С помощью различных способов исследования было показано, что существует две области разрешенных конформаций, называемых син- и антиконформациями.

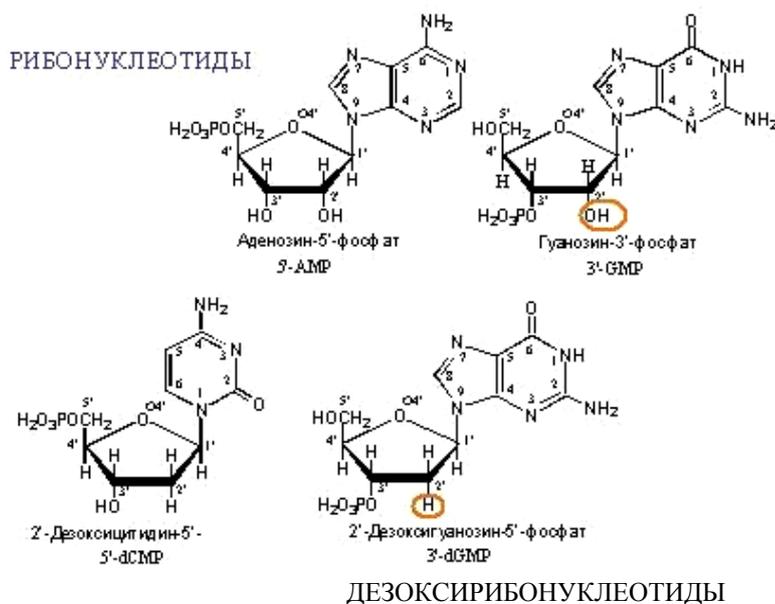


Анти-аденозин



Син-аденозин

Нуклеотиды – фосфорные эфиры нуклеозидов.



У рибонуклеотидов остаток фосфорной кислоты может находиться в положениях 2' и 3' и 5', у дезоксирибонуклеотидов – в положениях 3' и 5'. В зависимости от числа имеющих в молекуле нуклеотида остатков фосфорной кислоты различают моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов.

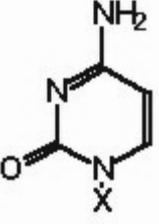
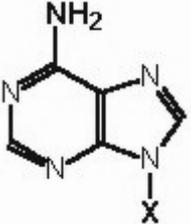
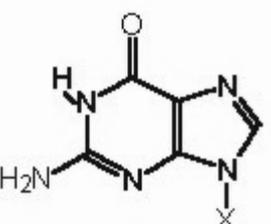
Сокращенные обозначения (однобуквенные и трехбуквенные) азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов широко используются в биохимии и приведены в [таблице 10.1](#).

Таблица 10.1

Сокращенные обозначения азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов

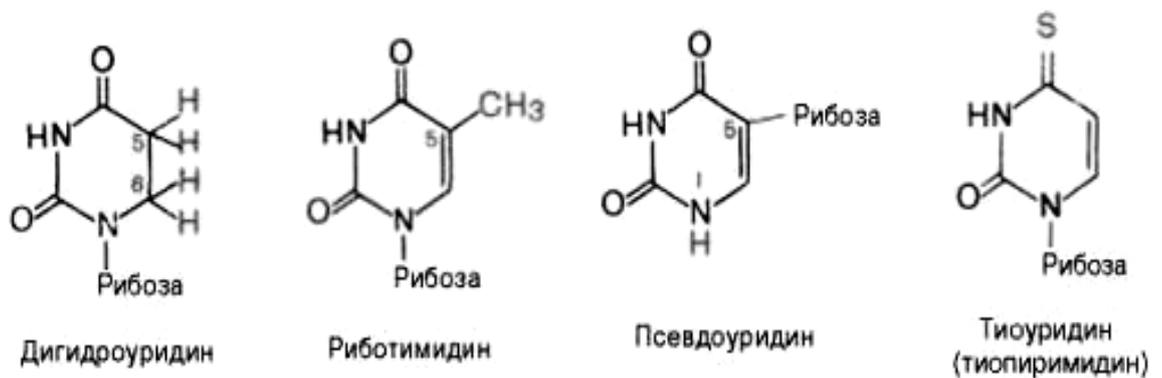
Структура	Основание (X=H)	Нуклеозид X= рибоза (или дезоксирибоза)	Нуклеотид X= рибозофосфат (или дезоксирибозофосфат)
	Урацил, U, Ura	Уридин, U, Urd	Уридинмонофосфат, UMP
	Тимин, T, Thy	Тимидин, T, dThd Риботимидин, Thd	Тимидинмонофосфат, TMP

Окончание табл. 10.1

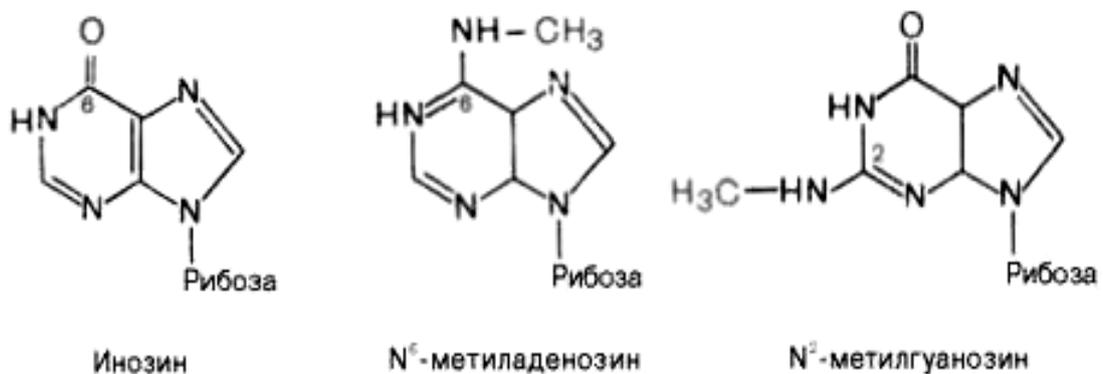
	Цитозин, С, Cyt	Цитидин, С, Cyd, (dCyd)	Цитидинмонофосфат, CMP
	Аденин, А, Ade	Аденозин, А, Ado, (dAdo)	Аденозинмонофосфат, AMP
	Гуанин, G, Gua	Гуанозин, G, Guo, (dGuo)	Гуанозинмонофосфат, GMP

На практике часто используют однобуквенное обозначение нуклеотидов с указанием положения фосфатной группы. Например, рА – это аденозин-5'-фосфат; Ар □ аденозин-3'-фосфат; рdG □ дезоксигуанозин-5'-фосфат.

Кроме основных пуриновых и пиримидиновых оснований, формирующих нуклеиновые кислоты, встречаются минорные основания. К пуриновым минорным основаниям относятся такие: инозин, N₆-метиладенин, N₂-метилгуанин, ксантин, гипоксантин, 7-метилгуанин и др. К пиримидиновым основаниям относятся такие: 5-метил- и 5-окси-метилцитозин, дигидроурацил, 1-метилурацил, оротовая кислота, 5-карбоксивурацил, 4-тиоурацил и др. Например, в состав нуклеотидов тРНК входят минорные основания в количестве 60 оснований на молекулу. В тРНК они выполняют 2 функции: делают тРНК устойчивыми к воздействию нуклеаз цитоплазмы и поддерживают определенную третичную структуру молекулы, т.к. не могут участвовать в образовании комплементарных пар и препятствуют спирализации определенных участков в полинуклеотидной последовательности тРНК.



Пиримидиновые минорные нуклеозиды и основания



Пуриновые минорные нуклеозиды и основания

Нуклеотиды AMP, GMP, CMP, UMP входят в состав рибонуклеиновых кислот. В состав дезоксирибонуклеиновых кислот входят dAMP, dGMP, dCMP, dTMP (дезокситимидинмонофосфат, или дезокситимидиловая кислота).

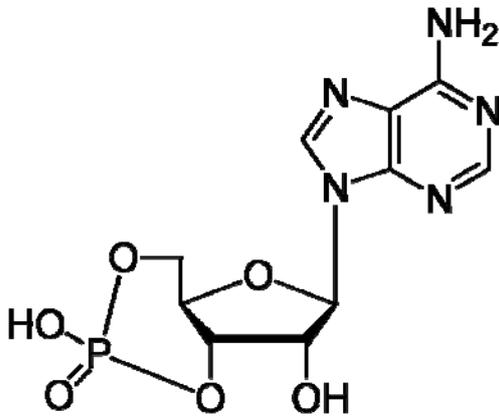
Нуклеотиды не только формируют нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). Кроме того, они выступают в роли универсальных источников энергии в живых организмах. Они и их производные имеют самостоятельное значение и необходимы для протекания обменных процессов. Велика роль нуклеотидов, выполняющих кофакторную функцию и принимающих непосредственное участие в химической реакции, выступая в качестве акцептора или донора химических группировок, атомов, электронов.

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺) и его фосфорное производное (NADP⁺) функционируют как коферменты в реакциях дегидрирования, забирая от донора (например, восстановленного субстрата) два электрона и один протон, переходя в восстановленную форму – NADH+H⁺ и NADPH+H⁺, соответственно.

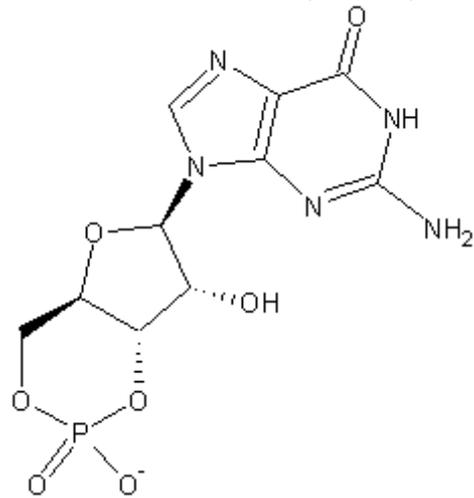
Циклические нуклеотиды

Циклические нуклеотиды – это нуклеотиды, у которых образуется химическая связь между двумя атомами углерода рибозы. Биологическое зна-

чение имеют циклические нуклеотиды со связью между $C_{3'}$ и $C_{5'}$ углеродными атомами рибозы. Наиболее изученными являются производные аденозина и гуанозина – циклический АМР (сАМР) и циклический ГМР (сГМР).



сАМР



сГМР

Основными функциями циклических нуклеотидов являются передача и усиление молекулярного сигнала при действии различных биологически активных соединений (гормонов, цитокинов и др.); сАМР, как вторичный мессенджер, регулирует различные функции клетки путем активации или ингибирования специфических клеточных белков. Изменяя активность белков, сАМР регулирует экспрессию специфических генов. сГМР участвует в преобразовании зрительного сигнала у животных.

Лекция 11

Строение, свойства, биологическая роль нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты являются биологическими полимерами. Мономерными звеньями ДНК и РНК являются нуклеотиды – фосфорные эфиры нуклеозидов. В природе существует два типа нуклеиновых кислот: ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота).

Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны фосфодиэфирными связями. Как в ДНК, так и в РНК эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН-группы одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН-группы другого ([рис. 11.1](#)). Такую межнуклеотидную связь называют 3',5'-фосфодиэфирной.

Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково. Благодаря полярности каждая полинуклеотидная цепь имеет 5'-конец и 3'-конец. Из-за наличия 2'-ОН группы у рибозы межнуклеотидные связи в РНК значительно лабильнее, чем в ДНК; они легко гидролизуются в присутствии щелочи.

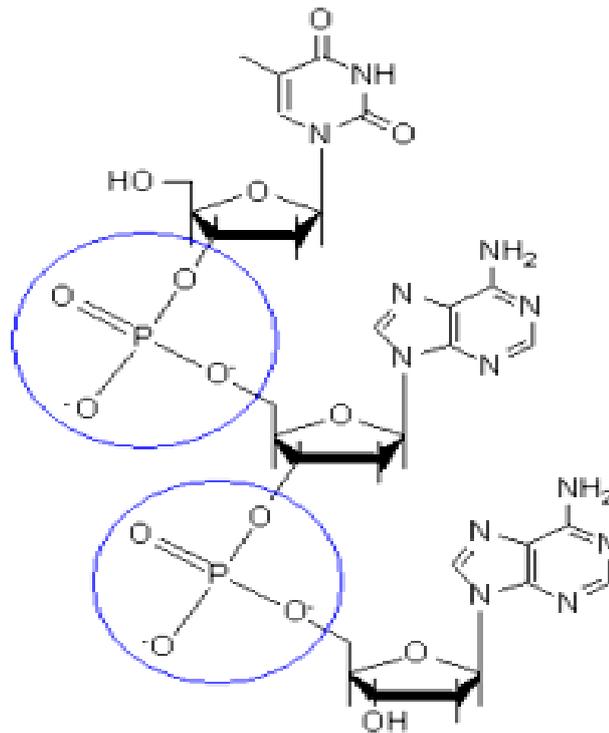


Рис. 11.1. Фосфодиэфирная связь в молекуле ДНК

В настоящее время разработаны и с успехом применяются способы определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Исходную молекулу ДНК предварительно фрагментируют с помощью рестриктаз. При этом осуществляют независимое расщепление ДНК двумя и более рестриктазами, в результате чего образуются перекрывающиеся фрагменты. Это позволяет после определения нуклеотидной последовательности соответствующих фрагментов реконструировать первичную структуру всей ДНК.

Существует два принципиально различных подхода к определению первичной структуры ДНК. В основе первого лежат химические реакции, в которых используются непосредственно фрагменты очищенной ДНК, во втором случае используют ДНК-копии очищенных сегментов, полученных ферментативным путем. Оба метода полностью автоматизированы. При секвенировании ДНК по методу Ф. Сэнгера вводят флуоресцентные метки, причем для каждого из четырех анализируемых нуклеотидов используются флуоресцирующие агенты с различными спектральными характеристиками, что позволяет сканировать гели при различных длинах волн и передавать информацию непосредственно в компьютер.

В методе А. Максама и У. Гилберта используется химическое секвенирование, основанное на химической модификации пуриновых и пиримидиновых оснований с последующим выщеплением модифицированных нуклеотидов из полимерной цепи и анализом образовавшихся продуктов методом гель-электрофореза. В 5'-конец анализируемого участка ДНК, с использованием фермента полинуклеотидкиназа из фага g-32P (АРФ) вводится радиоактивная метка. Сразу после введения метки одноцепочечные фрагменты секвенируют, а двуцепочечные с помощью денатурации разделяют на отдельные

цепи. Далее анализируемый образец разделяют на четыре порции, каждую из которых специфически обрабатывают, приводят к выщеплению определенного вида нуклеотидов. При этом используют диметилсульфат, который метилирует пуриновые основания (аденин по положению N₃, а гуанин по положению N₇), а также гидразин, который расщепляет и модифицирует пиримидиновые основания. Далее, используя обработку пиперидином и гидролиз при различных значениях pH, осуществляют выщепление определенных модифицированных оснований, сопровождающееся разрывом соседних фосфодиэфирных связей. Таким образом, для каждой из четырех анализируемых проб получают набор небольших по размеру фрагментов ДНК, часть из которых несет радиоактивную метку. Все эти фрагменты разделяют методом электрофореза, который позволяет разделять фрагменты, отличающиеся по длине на один нуклеотид. Полученные электрофореграммы проявляют с помощью рентгеновской пленки. В результате выявляются только радиоактивные фрагменты, по которым и определяют нуклеотидную последовательность анализируемой ДНК.

Итак, первичная структура нуклеиновых кислот – это порядок чередования нуклеотидных остатков в полинуклеотидной цепи.

Вторичная структура первоначально была предложена Дж. Уотсоном и Ф. Криком (1953 г.). В основу организации этой вторичной структуры легли установленные закономерности химического состава ДНК (правило Чаргаффа): молярное содержание в ДНК пуринов равно содержанию пиримидинов, а именно содержание аденина равно содержанию тимина $A/T=1$; суммарное содержание аденина и гуанина равно суммарному содержанию цитозина и тимина – $(A+G)=(C+T)$, $(A+G)/(C+T)=1$; количество 6-аминогрупп, входящих в состав оснований ДНК (аденин и цитозин), равно количеству 6-кетогрупп имеющихся оснований (гуанин и тимин).

Рентгенограммы волокон ДНК указывали на то, что молекула ДНК обладает спиральной структурой и содержит более одной полинуклеотидной цепи. Кислотно-щелочное титрование показывало, что её структура стабилизирована водородными связями.

На основании этих данных Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили трехмерную модель ДНК (рис. 11.2). Согласно их модели ДНК представляет собой правильную правовинтовую спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными друг относительно друга и вокруг воображаемой оси. Полинуклеотидные цепи антипараллельны, т.е. если одна из них ориентирована в направлении 3'–5', то вторая – в направлении 5'–3'. Поэтому на каждой из концов молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи.

Все азотистые основания цепей расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов – снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счет водородных связей, которые образуются между аденином одной цепи и тимином другой. При этом образуются две водородные связи: одна – между амино- и кетогруппами, другая – между двумя атомами азота пурина и пиримидина соответственно. Между гуанином

и цитозинном образуются три водородные связи: две из них – между амино- и кетогруппами соответствующих оснований, третья – между атомами азота пурина и пиримидина. В связи с этим последовательность в одной цепи определяет их последовательности в другой. Это и есть принцип комплементарности – ключевое свойство ДНК. При таком сочетании оснований в полинуклеотидных цепях каждая пара содержит по три кольца, поэтому общий размер этих пар оснований одинаков по всей длине молекулы.

Диаметр спирали постоянен вдоль всей её длины и равен 2,0 нм. Пуриновые и пиримидиновые основания обеих цепей стекинг – взаимодействиями уложены в «стопки» с интервалом 0,34 нм; плоскости колец слегка смещены относительно друг друга. Полный оборот спирали (длина витка спирали), который соответствует её периоду идентичности, равен 3,40 нм. На один виток спирали приходится 10 нуклеотидных остатков в одной цепи. В образованной структуре различают две бороздки: – большую шириной 2,2 нм; малую шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации хроматина.



Рис. 11.2. Двойная спираль ДНК (по Дж. Уотсону и Ф. Крику)

Молекулы ДНК могут находиться в различных конформационных состояниях в зависимости от степени обводненности биомолекулы, ионной силы окружающей среды, типов катионов, а также температуры.

Правозакрученные спирали образуют два семейства: А-семейство и В-семейство. А-семейство ДНК представлено так называемой А-формой ДНК, изученной Р. Франклиным и выделенной при малой влажности. Эта полиморфная форма ДНК имеет C_3 -эндоконформацию сахара, что приводит к уменьшению расстояния между фосфатными группами и, следовательно, уменьшению расстояния между нуклеотидными парами вдоль оси спирали. Это в свою очередь ведет к увеличению количества нуклеотидов на витке спирали (11 нуклеотидных остатков на витке вместо десяти). Пары оснований в А-форме образуют с осью спирали угол около 20° и очень сильно отодвинуты от оси спирали к периферии молекулы: сдвиг достигает 0,4-0,5 нм т.е. почти половины радиуса. Вследствие этого А-форма ДНК при взгляде сверху \square вдоль оси спирали выглядит, как труба. В А-форме ДНК в стекинге участвуют основания, принадлежащие разным цепям, т.е. имеет место как одно-, так и двуцепочечный стекинг. Это связано с величиной угла наклона плоскостей оснований к оси спирали и углом поворота оснований вокруг оси спирали. В настоящее время доказано наличие А-формы ДНК у некоторых бактерий, превращающихся в споры в неблагоприятных условиях и способных находиться в таком состоянии до тех пор, пока не появятся условия для размножения. Их ДНК окружена споровыми белками и находится в А-форме, что придает ей большую (примерно в 10 раз) устойчивость к действию ультрафиолетового излучения, по сравнению с ДНК, в других формах. Эти исследования подтвердили биологическую значимость А-формы ДНК ([рис.11.3](#)).

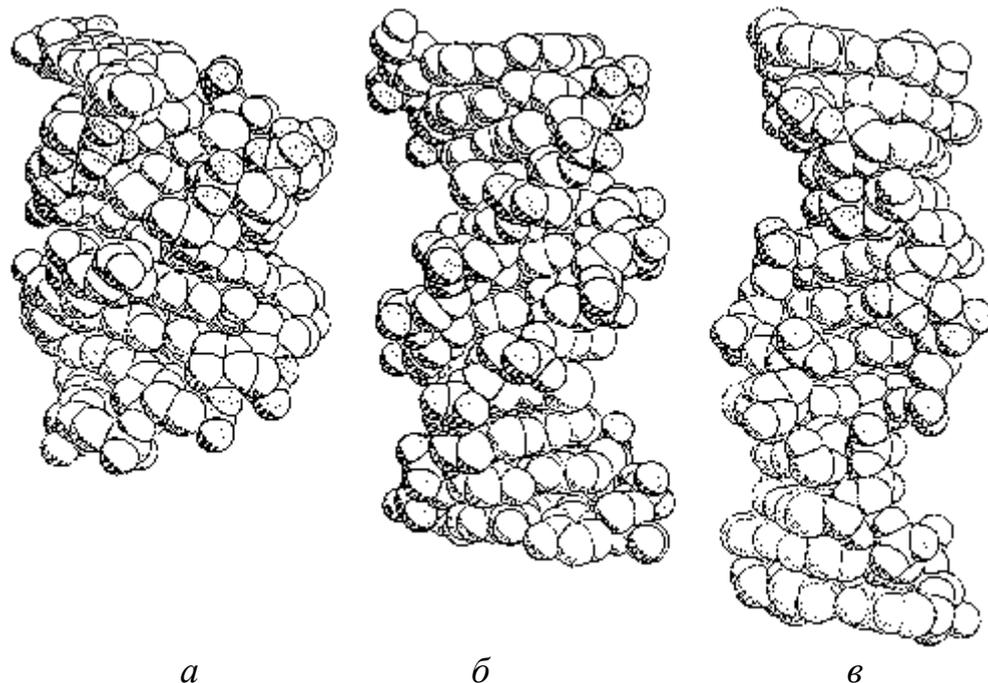


Рис. 11.3. Формы ДНК: а – А-ДНК, б – В-ДНК, в – Z-ДНК

Для В-форм ДНК характерно структурное разнообразие. Формы ДНК со случайными последовательностями могут находиться в В-, С-, D- и других конформационных состояниях при разных концентрациях ионов и темпера-

туры. Между этими различными формами осуществляются взаимные переходы, что обуславливается различиями в степени обводненности биомолекулы и ионной силы окружающей среды.

Считают, что разные формы ДНК соответствуют различным функциональным состояниям. Так, А-форма характерна для процессов транскрипции; в репликативных процессах ДНК находится в В-форме; С-форма наиболее подходит для «упаковки» ДНК в надмолекулярные структуры и образования различных состояний хроматина, в том числе и для хранения информации.

Z-форма ДНК имеет левозакрученную спираль и обнаружена у полинуклеотида с чередующейся последовательностью (dG-dC). Особенность Z-формы состоит в чередовании конформаций нуклеотидных остатков \square син- и антиконформаций нуклеотидов. Стекинг оснований обладает новыми, характерными лишь для этой спирали свойствами. Он имеет место между остатками цитозина противоположных цепей, а остатки гуанина вообще не взаимодействуют, а контактируют с соседними атомами дезоксицитидина. Фосфаты в Z-форме не эквивалентны друг другу. Фосфатный радиус спирали (расстояние фосфата до оси спирали) у d(CpG) равен 0,62 нм, у d(GpC) – 0,76 нм. Соседние сахара ориентированы в противоположные стороны, отчего линия, последовательно соединяющая атомы фосфора в цепи, приобретает зигзагообразный вид. Возможны переходы ДНК из В-формы в Z-форму.

Область перехода перемещается вдоль спирали в виде небольшой петли. Переход В-формы ДНК в Z-форму на небольшом участке молекулы ДНК оказывает очень сильное влияние на топологию сверхспиральной ДНК и используется клеткой в процессе экспрессии генов.

С помощью антител удалось обнаружить Z-форму ДНК в междисковых областях полигенных хромосом. Вероятно, Z-форма ДНК выполняет какую-то регуляторную роль в функциональных состояниях ДНК, поскольку возможны и обратные переходы из Z-формы в В-форму. Каждая форма ДНК имеет бороздки определенного размера. У Z-формы есть только один малый желобок, через который проходит ось спирали; он глубокий и узкий, с двух сторон ограничен фосфатными группами. Внутри двойной спирали – конформационная микрогетерогенность.

Каждая форма ДНК имеет малую и большую бороздки определенных размеров. С различными размерами желобков связана специфическая способность форм ДНК к комплексообразованию. В большей степени, чем другие участки молекулы ДНК, бороздки доступны молекулам воды и ионам металлов. Стабилизирующее действие молекул воды направлено на усиление стэкинг-взаимодействий; в случае ослабления последних молекулы воды конкурентно взаимодействуют с протонно-донорными и протонно-акцепторными центрами оснований, дестабилизируя двойную спираль. Гидратация ДНК играет важную роль в превращении А-формы в В-форму, и наоборот. Катионы связываются в основном с пентозофосфатным остовом, располагаясь преимущественно в малом желобке двойной спирали. Всё это подчёркивает динамичность структуры ДНК и возможность конформационных переходов в ней под действием агентов окружающей среды.

Биспиральные структуры в молекуле ДНК могут возникнуть и в пределах одной полидезоксирибонуклеотидной цепи. Для этого в последовательности ДНК должны присутствовать инвертированные, или палиндромные, повторяющиеся последовательности длиной от нескольких до многих тысяч пар оснований. Благодаря наличию собственной симметрии второго порядка палиндромы могут создавать «шпильчатые» структуры крестообразной формы, которые обеспечивают специфические нуклеиново-белковые взаимодействия и, возможно, участвуют в процессах регуляции.

Некоторые характеристики различных форм ДНК приведены в [табл. 11.1](#).

Таблица 11.1

Характеристика некоторых форм ДНК

Показатель	А-форма	В-форма	С-форма	Д-форма	Z-форма
Число пар нуклеотидных остатков на виток	11	10	9,3	8,0	12
Угол наклона плоскостей оснований к оси спирали, гр.	20	-2	-6	-6	-7
Угол поворота оснований вокруг оси спирали, гр.	32,7	36	38,6	45,0	-30,0
Расстояние от комплементарных пар до оси спирали, нм	0,425	0,063	0,213	0,143	-
Расстояние между нуклеотидными остатками по высоте спирали, нм	0,256	0,338	0,332	0,304	0,340
Угол между плоскостями комплементарных оснований, гр.	8	5	5	-	-
Конформация дезоксирибозы	C _{3'} -эндо	C _{2'} -эндо	C _{2'} -эндо	C _{2'} -эндо	C _{2'} -, C _{3'} -эндо

Суперспирализация ДНК формирует третичную структуру, которая образуется с помощью разнообразных белков. Все связывающиеся белки с ДНК эукариот можно разделить на гистоновые и негистоновые. Белковый кор образуется при взаимодействии гистонов H2A, H2B, H3 и H4 в виде октамера и

называется «нуклеосомный кор». Молекула ДНК «накручивается» на поверхность гистонового октамера длиной в 146 нуклеотидных пар, что составляет 1,75 оборота. Такой комплекс белков с ДНК служит основной структурной единицей хроматина и носит название «нуклеосома» (рис. 11.4).

ДНК, располагающуюся между нуклеосомами, называют линкерной ДНК. Её длина около 60 нуклеотидных пар. Молекулы гистона Н1 «подтягивают» отдельные нуклеосомы и тем самым укорачивают размеры ДНК в семь раз. Такие архитектурные образования защищают ДНК от воздействия нуклеаз.

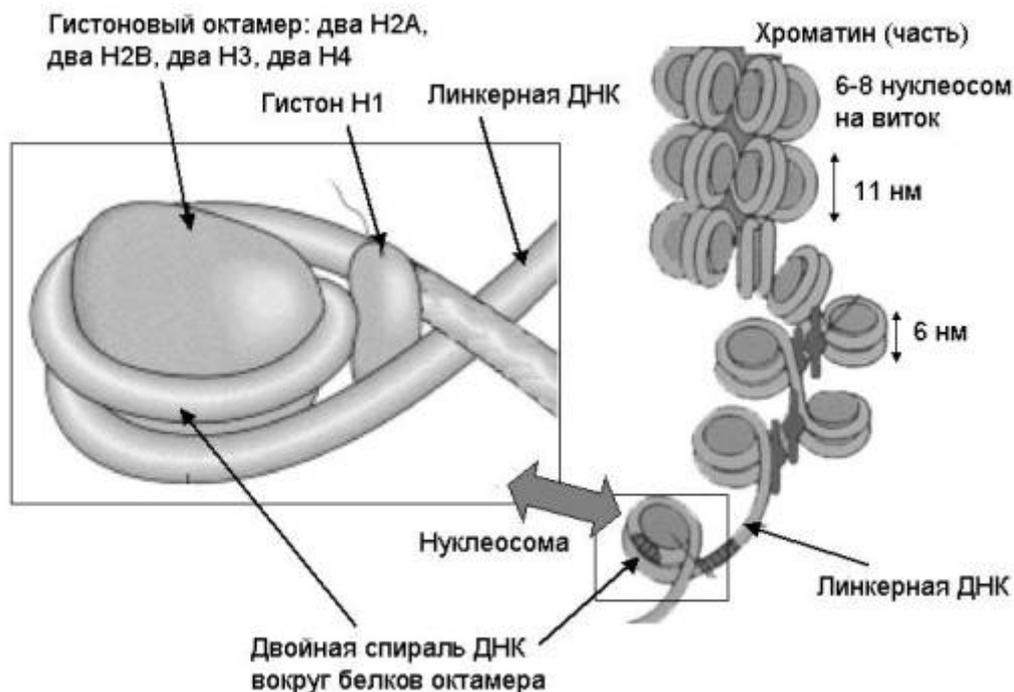


Рис. 11.4. Нуклеосомный уровень организации ДНК

Дальнейшие уровни компактизации молекулы ДНК происходят с участием негистоновых белков; при этом каждый белок комплементарен определенной последовательности нуклеотидов ДНК (сайт ДНК). К этой группе относят семейство сайтспецифических белков типа «цинковые пальцы». Каждый «цинковый палец» узнает определенный сайт, состоящий из пяти нуклеотидных пар.

Другое семейство сайт-специфических белков – гомодимеры. Фрагмент такого белка, контактирующего с ДНК, имеет структуру «спираль-поворот-спираль». К группе структурных и регуляторных белков относятся белки высокой подвижности (HMG-белки), которые постоянно ассоциированы с хроматином. Для них характерна маленькая молекулярная масса и высокое содержание заряженных аминокислот. К негистоновым белкам относятся ферменты репликации, транскрипции, трансляции. При участии структурных, регуляторных белков и ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК, нить нуклеосом преобразуется в высококонденсированную, нуклеопротеиновую

структуру – хромосому, которая в 10000 раз короче исходной молекулы ДНК. Основной функцией ДНК является хранение и передача наследственной информации в ряду поколений.

В цитоплазме клеток присутствуют три типа РНК: – транспортные (тРНК), матричные (мРНК) и рибосомальные (рРНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, конформации, продолжительности жизни и выполняемым функциям.

Первичная структура РНК – порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов в полинуклеотидной цепи. Нуклеотиды в РНК, как и в ДНК связаны 3',5'-фосфодиэфирными связями. На одном конце полинуклеотидной цепи находится фосфорилированная ОН-группа 5'- углеродного атома, на другом – ОН-группа 3'-углеродного атома рибозы. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Для всех типов РНК характерно наличие специализированных участков. Отдельные участки РНК за счет водородных связей с комплементарными азотистыми основаниями образуют петли – «шпильки». Участки цепи РНК спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны. В них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не образующие двойную спираль.

Транспортные РНК

Независимо от различий в последовательности нуклеотидов, пространственная структура любых тРНК описывается универсальной моделью «клеверного листа». Последовательность тРНК включают 70-90 нуклеотидов и около 10% минорных компонентов. Структура «клеверного листа» состоит из четырех или пяти двуцепочечных спиральных стеблей и трех петель ([рис. 11.5](#)).

Каждый стебель содержит 4-7 пар комплементарных оснований. Различают акцепторный, антикодонавый, дигидроуридиловый, псевдоуридиловый и добавочный «стебли». Акцепторный «стебель» содержит 3'- и 5'-концы полинуклеотидной цепи. К 3'-концу, оканчивающемуся ССА-ОН, присоединяется специфическая аминокислота, отвечающая последовательности антикодонавого триплета в антикодонавой петле. Число нуклеотидов в «стеблях» и петлях, кроме варибельной петли, постоянно (от 4 до 21 нуклеотида). Разные тРНК содержат инвариантные основания (присутствуют во всех тРНК), ответственные в «третичных» взаимодействиях за образование Г-образной структуры ([рис. 11.6](#)).

Г-образная структура состоит из двух спиралей расположенных почти перпендикулярно в А-РНК, длина которой равна около 7 нм, ширина – 2 нм. Одну спираль образуют «уложенные» друг за другом антикодонавый (А) и дигидроуридиловый (D) «стебли», другую – акцепторный и псевдоуридиловый (Т) «стебли». В состав тРНК входят минорные основания, представленные метилированными основаниями, изомерами и аналогами пиримидинов. Минорные основания выполняют две функции: они делают тРНК устойчи-

выми к действию нуклеаз и поддерживают определенную третичную структуру молекулы, т.к. не участвуют в образовании комплементарных пар и препятствуют спирализации определенных участков тРНК. Антикодон имеет жесткую архитектуру, которая позволяет ему быстро считывать матричную РНК.

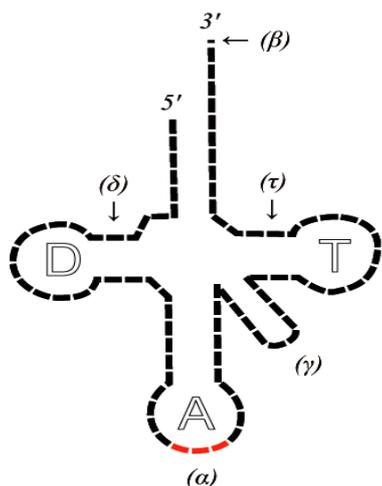


Рис. 11.5. тРНК



Рис. 11.6. тРНК (третичная структура)

Матричные РНК

Матричные РНК эукариот и прокариот различаются по строению. Более сложную организацию имеют матричные РНК. Этот тип РНК, независимо от уникальности кодирующих последовательностей нуклеотидов, имеет одинаковое строение 5'- и 3'-концов.



Схема строения матричной РНК эукариот

На 5' конце присутствует модифицированный нуклеотид 7-метилгуанозин-5'-трифосфат – кэп (от англ. cap – «шапочка», [рис. 11.7](#)). Несколько десятков нуклеотидов (5'-нетранслируемая область) отделяют кэп от иницирующего кодона, (обычно это – -AUG-), далее идет кодирующий участок, а за ним следует один из терминирующих кодонов (-UGA-, -UUA-, -UAG-). За стоп-кодоном идет 3'-нетранслируемая область и далее полиаденилатный «хвост», состоящий из 50-400 оснований. Полагают, что полиаденилатная область молекулы мРНК участвует в процессинге мРНК, предохра-

деляет время жизни мРНК, способствует переносу мРНК из ядра в цитоплазму и принимает участие в трансляции. Предполагают, что вторичная (спирализация сама на себя) и третичная структуры менее компактны, чем тРНК и рРНК.

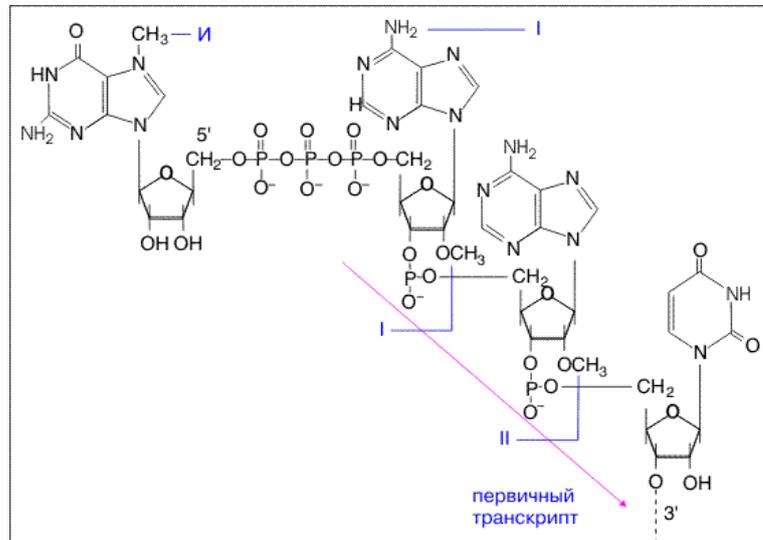


Рис. 11.7. Структура кэпа (И – инвариантный сайт, метилируемый у кэп-групп всех типов, I, II – сайты, метилируемые у кэп-групп типов 1 и 2 соответственно)

Строение прокариотических матричных РНК проще чем у эукариот – отсутствует «кэп» и полиаденилатный «хвост».

Рибосомальные РНК

Они принимают участие в образовании рибонуклеопротеинов, формирующих немембранные комплексы – рибосомы. Клетки прокариот и эукариот содержат рибосомы, имеющие общий план строения. В рибосомы входят высокомолекулярные рРНК, дающие начало 30S-40S- и 50S-60S-субчастицам рибосом; рРНК взаимодействуют с мРНК и аминоацил-тРНК в процессе трансляции. 5S-рРНК выступает в роли посредника между пептидилтрансферазным центром и доменом белкового фактора трансляции, обладающим GTP-азной активностью.

Рибосомальные РНК содержат несколько модифицированных нуклеотидов. Чаще всего это метильные производные азотистых оснований или рибозы. Вторичная структура рРНК характеризуется спирализацией самой на себя полирибонуклеотидной цепи. Биспиральные и линейные участки этих молекул формируют постоянные переменные домены, которые затем укладываются в более компактные структуры более высокого порядка (рис. 11.8).

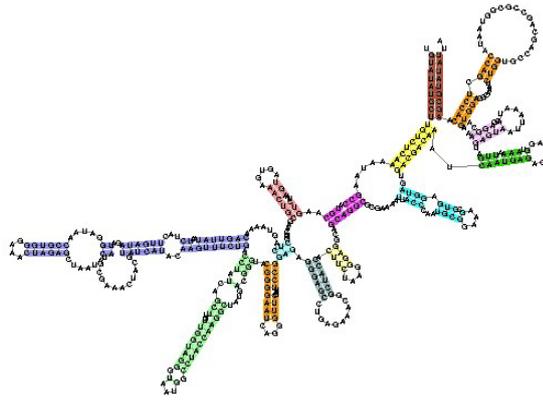


Рис. 11.8. Рибосомальная РНК

Остановимся на малых ядерных РНК. В ядрах всех эукариотических клеток содержится множество коротких и стабильных молекул РНК. Они локализованы в сплайсосомах млекопитающих и называются U-РНК из-за необычайно большого содержания урацила и его модифицированных форм.

Нуклеотидные последовательности всех U-РНК позвоночных совпадают на 95%. В сплайсосому, кроме пяти типов U-РНК, обладающих ферментативной активностью и названных рибозимами, входят еще 50 типов белков. Характерной чертой рибозимов является наличие липких концов, комплементарных концам интронов. Сплайсосома вырезает интроны – участки первичных транскриптов, не несущих информацию о белке.

В последние годы большой интерес исследователей направлен на изучение феномена малых РНК (siRNA). Различают цитоплазматические и ядерные малые РНК. В класс малых (коротких РНК) включают молекулы, содержащие от 20 до 300 нуклеотидов. Самые короткие из них – siRNA состоят из 21 – 28, а млекопитающих из 21 – 23 нуклеотидов. Особенностью этих молекул является то, что они в отличие от большинства других клеточных РНК, состоящих всего из одной цепи нуклеотидов, являются двунитчатыми. Нуклеотиды с противоположных цепей siRNA спариваются друг с другом по тем же законам комплементарности, которые формируют двунитчатые цепи в ДНК. Кроме того, по краям каждой из цепей siRNA всегда остаются два неспаренных нуклеотида.

Ядерным малым РНК отводится способность подавлять экспрессию генов у животных и растений. Эффект «гашения» определенных генов малыми РНК получил в молекулярной биологии название РНК-интерференции. Имеются доказательства, что у растений и низших животных организмов siRNA являются элементами «внутриклеточного иммунитета», позволяют быстро распознать и уничтожить чужую РНК.

Лекция 12

**Витамины – биологическая роль, классификация.
Водорастворимые витамины**

Витамины представляют собой сборную в химическом отношении группу низкомолекулярных органических веществ, жизненно необходимых для сбалансированного питания. Витамины не синтезируются в организме человека и животных или синтезируются, но в малых количествах, тканями, а также микрофлорой кишечника, присущей организму. Это недостаточно для нормальной жизнедеятельности. Для человека основными источниками витаминов являются высшие растения.

Между витаминами и другими составляющими частями пищи существуют тесные взаимоотношения, объясняемые общностью, единством обмена веществ. В животном мире имеется видовое различие в потребности в отдельных витаминах, что связано с возможностью или невозможностью их достаточного синтеза в организме. Так, аскорбиновая кислота является витамином для человека, обезьяны и морских свинок, тогда как крысы и собаки синтезируют его в процессе промежуточного обмена веществ.

В норме суточная потребность в витаминах мала, однако на потребность в витаминах могут существенно влиять увеличение физической нагрузки, интенсивность умственного труда, физиологическое состояние, возраст, пол, условия окружающей среды.

Поступая в организм с пищей, витамины (большинство из них) выполняют коферментную роль в ферментативных реакциях обмена. Кроме того, они являются компонентами биологически активных веществ, выступают в роли антиоксидантов. Анализ структуры коферментов позволяет выделить два функциональных центра, один из которых ответствен за связь с белком, а другой принимает участие непосредственно в каталитическом акте.

В витаминах нуждаются растения, которым эти вещества также необходимы для нормального развития и роста.

В ряде случаев в организм поступают предшественники витаминов, т.н. провитамины, которые в организме превращаются в активные формы витаминов.

Недостаток поступления витаминов с пищей, нарушение всасывания или их использования организмом приводит к развитию патологического состояния – первичные авитаминозы и гиповитаминозы. Напротив, чрезмерное потребление пищевых витаминных форм и/или несбалансированное питание может вызвать гипервитаминозное состояние, которое также является патологическим.

В медицинской и биологической литературе витамины подразделяются на две группы: растворимые в воде и растворимые в жирах. Отдельным витаминам присваивается буквенная, химическая и физиологическая номенклатура.

Жирорастворимые витамины приведены в [таблице. 12.1.](#)

Таблица 12.1

Жирорастворимые витамины

Буквенное обозначение	Наименование	Физиологическое действие
А	Ретинол	Антиксерофтальмический
D	Эргокальциферол	Антирахитический
Е	Токоферол	Антистерильный
К	Филлохинон	Антигемморагический

Водорастворимые витамины приведены в [таблице 12.2](#)

Таблица 12.2

Водорастворимые витамины

Буквенное обозначение	Наименование	Физиологическое действие
B ₁	Тиамин	Антиневритный
B ₂	Рибофлавин	Витамин роста
B ₃ (PP)	Никотиновая кислота, никотинамид	Антипеллагрический
B ₅	Пантотеновая кислота	Антидерматитный
B ₆	Пиридоксин	Антидерматитный
B ₉	Фолиевая кислота	Антианемический
B ₁₂	Цианкобаламин	Антианемический
H	Биотин	Антисеборейный
C	Аскорбиновая кислота	Антискорбутный
P	Рутин	Капилляроукрепляющий
U	S-метилметионин	Противоязвенный

Раскрытие причин авитаминозов и механизма их действий на организм обосновало использование витаминов как лекарственных средств. По лечебно-профилактическому действию была дана следующая групповая характеристика некоторых витаминов. Витамины B₁, B₂, B₃, B₅, A и C регулируют функциональное состояние центральной нервной системы, обмен веществ и трофику тканей, поэтому их используют как препараты, повышающие общую реактивность организма. Витамины C, P, K обеспечивают нормальную проницаемость и устойчивость кровеносных сосудов, повышают свёртываемость крови, т.е. обладают антигеморрагическим эффектом. Витамины B₉,

V_{12} , С нормализуют и стимулируют кроветворение; их используют как антианемические препараты. Витамины С и А повышают устойчивость организма к инфекциям путем стимулирования синтеза антител и противовоспалительных веществ, усиления защиты эпителиев. Витамины А, V_2 и С усиливают остроту зрения, расширяют поле цветного зрения.

Среди витаминов есть «отношения» синергизма и антагонизма. Так, влияние витамина Р на проницаемость кровеносных сосудов усиливает витамин С; витамин А снижает токсическое действие антирахитического витамина D, что усиливает эффект последнего. Никотиновая кислота тормозит липотропное действие холина.

В отличие от витаминов есть вещества, обладающие антивитаминами свойствами. Примером может служить тиамин, имеющий высокую структурную специфичность. Если в тиамине изменить радикалы, образуется вещество вытесняющее тиамин из фермента, коферментом которого он является. Антивитаминами являются многие антибиотики и сульфаниамидные препараты.

Витамин V_1 (тиамин)

Его можно рассматривать как соединение, построенное из пиримидинового и тиазольного колец, соединенных метиновым мостиком (рис.12.1).

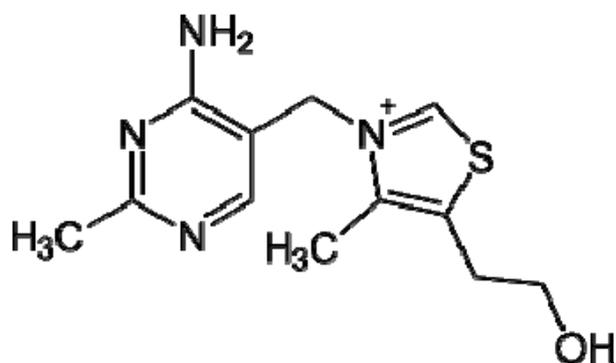


Рис. 12.1. Тиамин (витамин V_1)

Источником витамина V_1 являются продукты растительного происхождения. Особенно его много в пекарских и пивных дрожжах, оболочках семян хлебных злаков и риса, горохе, сое. В организме животных витамин V_1 содержится преимущественно в виде дифосфорного эфира. Фосфорилирование тиамин происходит в печени, почках, сердечной мышце, мозге при участии тиаминкиназы и АТФ.

Суточная доза для взрослого человека в среднем составляет 2-3 мг витамина V_1 . Преобладание углеводов в пищи повышает потребность организма в витамине; жиры, наоборот, резко уменьшают эту потребность.

Биологическая роль витамина V_1 определяется тем, что в виде тиаминдифосфата (ТДФ) он входит в состав как минимум трёх ферментов и фермен-

тативных комплексов: в составе пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов он участвует в окислительном декарбоксилировании пирувата и α -кетоглутарата; в составе транскетолазы TDP участвует в пентозофосфатном пути превращения углеводов.

При B_1 -авитаминозе и гиповитаминозе развивается полиневрит, который проявляется в прогрессирующей дегенерации нервных окончаний проводящих пучков, следствием чего является потеря кожной чувствительности, нарушение сердечной деятельности, нарушение моторной и секреторной функций желудочно-кишечного тракта, нарушение водного обмена, приводящих к параличу (бери-бери). При чрезмерных и длительных приёмах тиамина наступает гипervитаминозное состояние, которое проявляется в виде аллергических реакций (крапивница, кожный зуд, отек, одышка, кровоизлияния, судороги), вплоть до анафилактического шока.

Витамин B_2 (рибофлавин)

В основе структуры витамина B_2 лежит изоаллоксазин, соединенный со спиртом рибитолом (рис. 12.2).

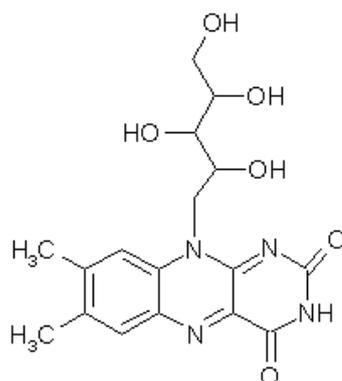


Рис. 12.2. Рибофлавин (витамин B_2)

Молекула рибофлавина обладает окислительно-восстановительными свойствами, что выражается в способности присоединять два атома водорода (при этом восстанавливаясь) и легко отдавать два электрона и два протона (окисляясь). Рибофлавин функционирует в составе флавинмононуклеотида (FMN) или флавинадениндинауклеотида (FAD). Образование коферментов происходит в слизистой оболочке желудка после всасывания витамина B_2

У рибофлавина имеются антагонисты, которые блокируют витамин путем конкуренции с FAD. К ним относятся диэтильные производные рибофлавина, галактофлавины, тетрациклины, левомицитин.

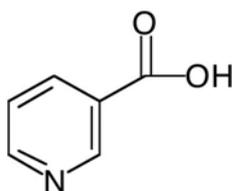
Источником витамина B_2 для человека являются молоко и молочные продукты, яйца, печень, почки, сердце животных, пивные и пекарские дрожжи, в меньшей степени крупы и овощи.

Суточная потребность в витамине В₂ взрослого человека составляет 1,8-2,6 мг. Частично человек получает рибофлавин как продукт жизнедеятельности микрофлоры кишечника.

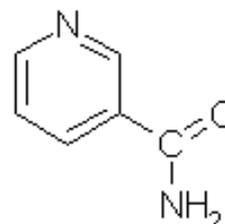
Полное отсутствие рибофлавина в пище вызывает острый авитаминоз, характеризующийся коматозным состоянием со смертельным исходом. При гиповитаминозе В₂ помимо задержки роста наблюдаются дерматиты на коже головы, выпадение волос, поражение слизистых оболочек, стоматиты, конъюнктивиты, помутнение хрусталика, поражение нервной системы, трофические язвы и светобоязнь. Гипервитаминозных состояний не наблюдается, так как рибофлавин не токсичен.

Витамин В₃ (РР, никотиновая кислота, никотинамид)

Никотиновая кислота является β-пиридинкарбоновой кислотой, а никотинамид – амидом.



Никотиновая кислота



Никотинамид

Никотиновая кислота широко распространена в растительных и особенно животных продуктах. Источником витамина РР являются печень, почки, сердце, мясо животных, рыба, из продуктов растительного происхождения – пшеничные и рисовые отруби, бобовые. Никотинамид может образовываться из триптофана при росте его дозы в пище.

Суточная потребность в этом витамине составляет 15-25 мг для взрослых, для детей – 15 мг.

Недостаточность витамина В₃ проявляется в особо болезненном состоянии называемом, пеллагрой, что в переводе с итальянского обозначает – «жесткая, шершавая кожа». Для пеллагры характерны 3 признака: дерматит, диарея, деменция («3Д»). Развитию клинической картины пеллагры предшествует гиповитаминозное состояние, характеризующееся вялостью, апатией, быстрой утомляемостью, бессонницей, цианозом лица, сухостью кожных покровов, падением массы тела и предрасположенностью к инфекциям. Начальная стадия заболевания пеллагрой выражается в воспалении слизистых оболочек рта, языка (глосситы) и желудочно-кишечного тракта (диарея, сменяемая запорами). Впоследствии появляются симметричные поражения кожи, развивается гипохромная анемия.

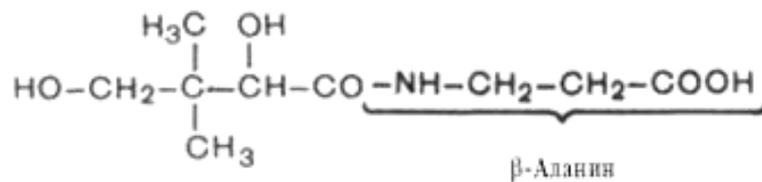
Биологическая роль никотиновой кислоты и её производного никотиамида связаны с коферментной функцией NAD и NADP различных дегид-

рогеназ, в которые она входит как составляющее звено. Недостаточность витамина РР вызывает нарушения азотистого, липидного и углеводного обменов. Отмечаются атрофия коркового слоя надпочечников и их гипофункция. Возникают глубокие нарушения центральной и периферической нервной системы, вплоть до паралича, мышечной атрофии и нарушений психики, что выражающееся в потере памяти, галлюцинациях и бреде.

Никотиновая кислота и её амид в больших дозах являются токсическими веществами и могут вызвать развитие аллергической реакции, сопровождающейся рвотой, судорогами, и даже вызвать жировую инфильтрацию печени.

Витамин В₅ (пантотеновая кислота)

По химическому строению витамин В₅ состоит из остатков D-2,4-дигидрокси-3,3-диметилмасляной кислоты и β-аланина, соединенных пептидной связью:



Пантотеновая кислота

Витамин В₅ входит в состав кофермента А, в форме которого пантотеновая кислота выполняет свою биологическую функцию (рис. 12.3). Коэнзим А участвует в переносе ацильных радикалов при активации синтеза жирных кислот, холестерина, кетоновых тел, детоксикации чужеродных веществ в печени.

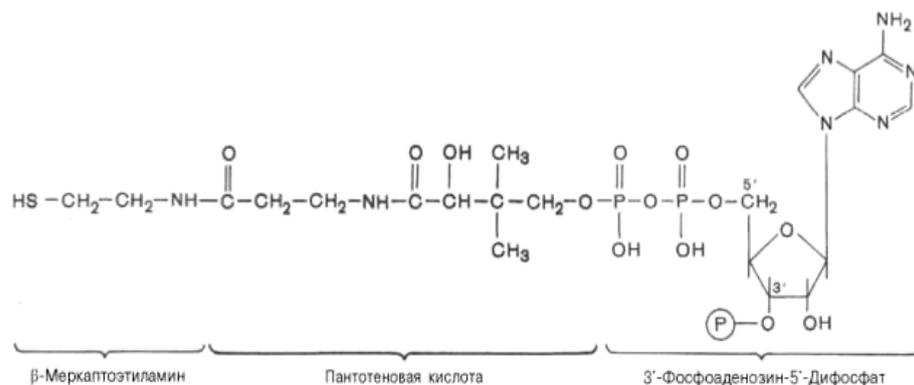


Рис. 12.3. Коэнзим А

Пантотеновая кислота широко распространена в природе. Источником получения витамина В₅ для человека являются рисовые и пшеничные отруби,

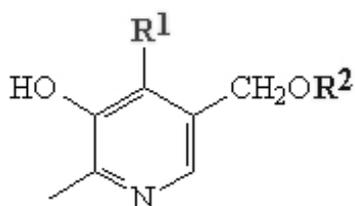
дрожжи, печень, почки, мясо животных, яичный желток, икра, цветная капуста, картофель, помидоры, яблоки, рыба.

Суточная потребность в этом витамине составляет для взрослых 10-15 мг. В кишечнике человека пантотеновая кислота в небольших количествах продуцируется кишечной палочкой.

Гиповитаминоз B_5 у человека встречается редко, т.к. содержание витамина достаточно в обычных продуктах питания. При недостаточности витамина B_5 у человека и животных поражаются кожные покровы, наблюдается потеря волос и перьев, их депигментация, поражаются слизистые оболочки внутренних органов, возникают дегенеративные изменения миелиновых оболочек спинного мозга, страдает центральная нервная система, сопровождающаяся параличами, а в крайних случаях наступает коматозное состояние и смерть. Низкий уровень витамина B_5 в крови часто сопровождается другими гиповитаминозами.

Витамин B_6 (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин)

В основе структуры витамина B_6 лежит пиридиновое кольцо. Известны 3 формы витамина B_6 , отличающиеся строением замещающей группы у атома углерода в п-положении к атому азота. Все они обладают одинаковой биологической активностью:



пиридоксин	$R1 = CH_2OH$	$R2 = H$
пиридоксаль	$R1 = C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown H \end{matrix}$	$R2 = H$
пиридоксамин	$R1 = CH_2NH_2$	$R2 = H$
пиридоксальфосфат	$R1 = C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown H \end{matrix}$	$R2 = PO_3H_2$
фосфорпиридоксамин	$R1 = CH_2NH_2$	$R2 = PO_3H_2$

Витамин B_6 в виде пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата, для образования которых расходуется АТФ при участии фермента пиридоксалькиназы, выполняет коферментную функцию. Пиридоксальные ферменты играют ключевую роль в обмене аминокислот, катализируя реакции трансаминирования и декарбоксилирования. Выявлена каталитическая функция пиридоксальфосфата в действии фосфорилазы, играющей, как известно, центральную роль в метаболизме гликогена в организме.

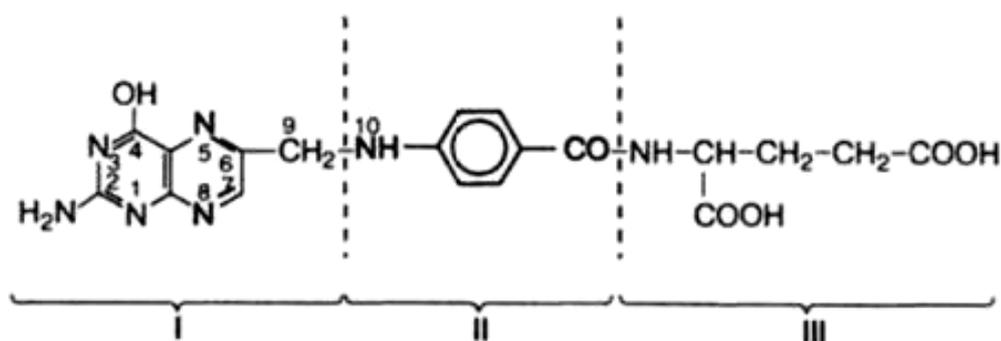
Витамин B_6 широко распространен в природе, синтезируется растениями и микроорганизмами, в том числе и микрофлорой кишечника. Однако того количества витамина B_6 , которое продуцируется микроорганизмами недостаточно для полного обеспечения витамином организма человека. Поэтому основным источником пиридоксина являются продукты питания. Наиболее богаты витамином B_6 сухие дрожжи, печень, почки, сердце, мясо, рыба, цельное зерно злаковых и их отруби, горох, бобы, свежий зеленый перец.

Суточная потребность составляет 2-3 мг.

Витамин В₆ относится к антидерматитным витаминам. Недостаточность витамина В₆ сопровождается дерматитами, стоматитами, глосситами, конъюнктивитами, гипохромной анемией, задержкой роста. Авитаминоз В₆ у детей проявляется повышенной возбудимостью. Развитие гиповитаминоза этого витамина может быть связано не только с недостаточным поступлением его в организм, но и с нарушением фосфорилирования пиридоксина в желудочнокишечном тракте при заболеваниях органов пищеварения.

Витамин В₉ (фолиевая кислота)

Фолиевая кислота состоит из трех структурных единиц: остатка птеридина (I), парааминобензойной кислоты (II) и глутаминовой кислоты (III).



Фолиевая (птероилглутаминовая) кислота

Витамин, полученный из разных источников, может содержать от трех до шести остатков глутаминовой кислоты. Фолиевая кислота метаболически неактивна, но после восстановления птеридинового кольца может превращаться в тетрагидрофолевую кислоту, обладающую коферментными свойствами ферментов, ответственных за перенос одноуглеродных групп (таких, как формил, метил, метилен, оксиметил). Присоединение одноуглеродных остатков к тетрагидрофолевой кислоте происходит с помощью ковалентной связи. Эти коферменты участвуют в синтезе пуриновых нуклеотидов, в превращении dUMP в dTMP, обмене глицина и серина.

Источниками фолиевой кислоты служат свежие овощи: салат, шпинат, капуста, лук, помидоры, морковь. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты фолиевой кислотой печень, почки, яичный желток, сыр, а также пивные и пекарские дрожжи.

Суточная потребность в фолиевой кислоте варьирует от 50 до 200 мкг; из-за плохой всасываемости этого витамина рекомендуемая суточная доза – 400 мкг. Наиболее характерными признаками авитаминоза фолиевой кислоты являются нарушение кроветворения, вызывающее малокровие (макроцитарная анемия), наблюдаются нарушения деятельности органов пищеварения, органов размножения и кожи. Этот авитаминоз может возникнуть в случае подавления микрофлоры кишечника лекарственными препаратами сульфа-

ниламидной природы – структурными аналогами парааминобензойной кислоты и/или при нарушении всасывания витамина в желудочно-кишечном тракте при его заболевании.

Тесная связь фолиевых коферментов с метаболизмом нуклеиновых кислот объясняет существенную роль витамина B₉ в жизнедеятельности организма. Некоторые производные птеридина тормозят пролиферацию клеток, в том числе и опухолевых, применяются для подавления опухолевого роста у онкологических больных.

Витамин B₁₂ (кобалами)

Структура цианкобаламина отличается большой сложностью, т.к. включает в свой состав металл кобальт (рис. 12.4).

Ни животные, ни растения не могут синтезировать витамин B₁₂. Это единственный витамин, который синтезируется почти исключительно бактериями, актиномицетами и сине-зелёными водорослями. Из животных тканей витамином B₁₂ наиболее богаты печень и почки.

Недостаточность витамина в тканях животных связана с нарушением всасывания кобаламина из-за нарушения синтеза внутреннего фактора Касла, в соединении с которым он всасывается. Фактор Касла синтезируется обкладочными клетками желудка и представляет собой гликопротеин. Для присоединения кобаламина к фактору Касла необходимы ионы кальция. Резекция желудка или повреждение его слизистой оболочки приводит к гиповитаминозу витамина B₁₂.

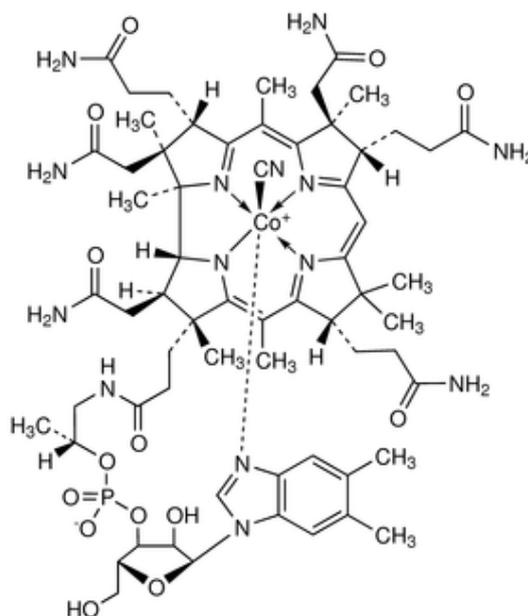


Рис. 12.4. Структура цианкобаламина (витамин B₁₂)

Витамин B₁₂ участвует в образовании двух коферментов: метилкобаламина в плазме и дезоксиаденозилкобаламина в митохондриях. Метилкобаламин как кофермент участвует в образовании метионина из гомоцистеина.

Кроме того, метилкобаламин необходим для превращений производных фолиевой кислоты и, в конечном итоге, для синтеза нуклеиновых кислот. Дезоксиаденозилкобаламин в качестве кофермента участвует в метаболизме жирных кислот с нечетным числом атомов углерода и аминокислот с разветвленной углеводородной цепью.

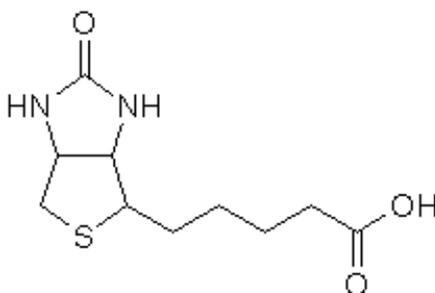
Гипо – и авитаминозные состояния приводят к нарушениям нормального кроветворения в костном мозге и развитию анемии (мегалобластная анемия), признаками которой являются снижение числа эритроцитов, увеличение их размеров, снижение концентрации гемоглобина. Нарушение кроветворения связано, в первую очередь, с нарушением обмена нуклеиновых кислот в быстроделющихся клетках кроветворной системы. Кроме того, наблюдаются расстройства деятельности нервной системы. Для гипервитаминоза витамина В₁₂ характерны токсические эффекты.

Суточная доза очень мала и составляет всего 1-2 мкг.

Источником цианкобаламина, кроме микрофлоры кишечника, являются печень, почки, сыр и рыбные продукты.

Витамин Н (биотин)

В основе строения биотина лежит тиофеновое кольцо, к которому присоединена молекула мочевины, а боковая цепь представлена валерьяновой кислотой.



биотин

Биотин устойчив к действию молекулярного кислорода и серной кислоты, но разрушается под действием пероксида водорода, бромной воды и некоторых неорганических кислот и щелочей.

Универсальным ингибитором биотина служит авидин – гликопротеин, содержащийся в сыром яичном белке. Авидин образует с биотином прочный комплекс, который не расщепляется ферментами пищеварительного тракта и не всасывается.

Биотин широко распространен в природе. Наиболее богаты биотином печень, почки, сердце быка, яичный желток, бобы, рисовые отруби, пшеничная мука, цветная капуста, соя. В обычных условиях человек получает достаточное количество биотина в результате бактериального синтеза в кишечнике. Суточная доза биотина не превышает 10 мкг.

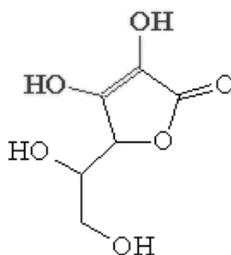
Биологическая функция биотина связана с выполнением коферментной функции, в составе карбоксилазы, участвующей в образовании активной

формы CO_2 . В организме биотин используется для образования малонил- CoA из ацетил- CoA , в синтезе пуринового кольца, а также в реакциях карбоксилирования пирувата с образованием оксалоацетата.

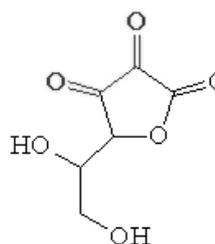
Недостаток биотина может наблюдаться при чрезмерном употреблении сырого яичного белка и нарушении всасывания при дисбактериозе кишечника, после приема больших количеств антибиотиков или сульфамидных препаратов, вызывающих гибель микрофлоры кишечника. При этом у человека наступает ряд патологических изменений, сопровождающихся выпадением волос, дерматитами, усиленным выделением жира сальными железами и развитием себореи. Наблюдается также поражение ногтей, часто отмечаются боли в мышцах, сонливость, быстрая утомляемость, депрессия.

Витамин С (аскорбиновая кислота)

Аскорбиновая кислота по своему строению является производным углеводов. Существует четыре оптических изомера аскорбиновой кислоты, два из которых обладают биологической активностью и имеют L-конфигурацию. В организме человека и животных восстановленная форма аскорбиновой кислоты (АК) и окисленная форма – дигидроаскорбиновая кислота (ДАГ) – могут быстро и обратимо переходить друг в друга, участвуя в окислительно-восстановительных реакциях.



L-Аскорбиновая кислота



Дигидроаскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота легко окисляется кислородом воздуха, пероксидом водорода и другими окислителями. Дигидроаскорбиновая кислота восстанавливается цистеином, глутатионом, сероводородом.

Витамин С синтезируется растениями и подавляющим большинством животных. Человек, обезьяны и морские свинки не синтезируют его.

Суточная потребность человека в витамине С является предметом спора. По рекомендациям одних исследователей необходимо принимать 50-75 мг аскорбиновой кислоты в сутки, другие считают, что суточная доза витамина – 100-500 мг.

Источником витамина С для человека являются плоды и корни шиповника, черная смородина, лимоны, апельсины, яблоки, свежий картофель, томаты, молоко, мясо.

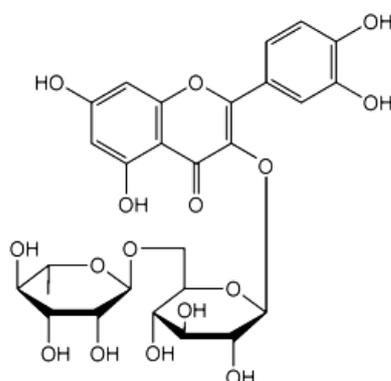
В живых системах АК и ДАК образуют окислительно-восстановительную пару с редокс-потенциалом +0,139 В. Благодаря этой

способности, аскорбиновая кислота участвует во многих реакциях гидроксирования (и прежде всего, пролина и лизина) при синтезе коллагена – основного белка межклеточного вещества соединительной ткани. Витамин С необходим при гидроксировании дофамина и синтезе гормонов коры надпочечников. В кишечнике аскорбиновая кислота восстанавливает Fe^{3+} в Fe^{2+} , способствуя его всасыванию, ускоряет освобождение железа из ферритина и превращение фолата в коферментную форму. При определенных концентрациях может выступать в роли про – и антиоксиданта. Л. Полинг рекомендовал использовать для профилактики и лечения простудных заболеваний большие дозы аскорбиновой кислоты (2-3 г/сут).

Недостаточность аскорбиновой кислоты приводит к заболеванию, называемому цингой или скорбутом. Вначале болезнь проявляется повышенной ломкостью кровеносных сосудов, общей слабостью, повышенной утомляемостью, кровоточивостью дёсен и повышенной восприимчивостью к инфекциям. Дальнейшее развитие заболевания сопровождается изъязвлением дёсен, расшатыванием и выпадением зубов, кровоизлияниями в кожу и толщу мышечной ткани, кровотечениям, разрушением костей нижних конечностей.

Витамин Р (рутин)

Понятие «витамин Р» включает семейство бифлавоноидов (катехины, флавонолы, флавоны), являющихся растительными полифенольными соединениями. В растениях флавоноидные соединения кроме катехинов и лейкоантоцианов встречаются в форме гликозидов. В частности, таким гликозидом, обладающим Р-витаминной активностью, является рутин. Рутин – гликозид, состоящий из кверцетина, глюкозы и рамнозы. Флавоноидные соединения с Р-витаминной активностью содержатся в растительном сырье, часто в комплексе с витамином С. Много витамина Р содержится в цветах и листьях гречихи, плодах цитрусовых и шиповника, ягодах черноплодной рябины, винограде, черной смородине, бруснике, чернике, клюкве, сливе, вишне.



Рутин

Биологическая роль флавоноидов заключается в стабилизации межклеточного матрикса соединительной ткани и уменьшении проницаемости ка-

пилляров. У витамина Р есть антивитамины, к которым относится ацетилсалициловая кислота. Физиологическое влияние биофлавоноидов на сосудистую стенку связывают с их участием в тканевом дыхании, со способностью воздействовать на некоторые ферментные системы через эндокринные железы. Многие представители группы витамина Р обладают гипотензивными свойствами.

Суточная потребность в витамине Р равняется 30-50 мг.

Клиническое проявление гиповитаминоза витамина Р характеризуется повышенной кровоточивостью дёсен, точечными подкожными кровоизлияниями (синдром «тесной одежды»), общей слабостью, быстрой утомляемостью и болями в суставах.

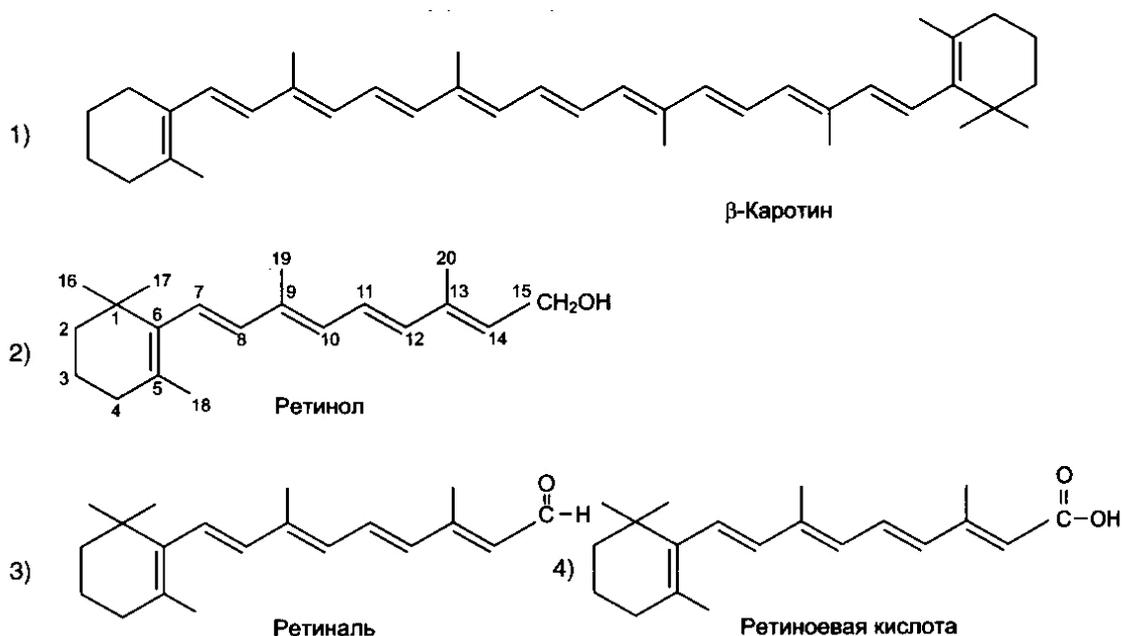
Синергистом витамина Р является аскорбиновая кислота, которая усиливает эффективность проявления витаминных свойств витамина Р. В медицинской практике часто при ломкости сосудов и кровоизлиях используют препарат аскорутин.

Лекция 13

Жирорастворимые витамины

Витамин А (ретинол)

Витамин А объединяет группу родственных соединений: β-каротин, ретинол, ретиналь, ретиновую кислоту и их эфиры. Ретинол представляет собой циклический, ненасыщенный, одноатомный спирт, в основе химической структуры которого лежит β-иононовое кольцо, к которому присоединена боковая алифатическая цепь, содержащая два остатка изопрена и спиртовую группу.



При окислении ретинол превращается в ретиналь. В тканях организма витамин часто находится в форме сложных эфиров с разными кислотами, чаще с уксусной, пальмитиновой, янтарной.

Витамин А содержится только в животных продуктах. Особенно им богаты рыбий жир, сливочное масло, печень, яичный желток.

В растениях, главным образом в овощах, содержатся провитамины, к которым относятся α -, β - и γ -каротины. Под воздействием каротиндиоксигеназы провитамины витамина А в организме человека и животных превращаются в ретинол. Каротиноиды отличаются друг от друга числом и характером иононовых колец. При гидролитическом расщеплении молекулы β -каротина, основного источника витамина А, образуются две молекулы последнего.

Суточная потребность в витамине А взрослого человека составляет от 1 до 2,5 мг или 2-5 мг β -каротина. Обычно активность витамина А в пищевых продуктах выражается в международных единицах (МЕ), одна международная единица витамина А эквивалентна 0,6 мкг β -каротина и 0,3 мкг витамина А.

При отсутствии в пище витамина А в организме животного и человека развивается ряд специфических патологических изменений: ослабление зрения (сумеречная или куриная слепота), поражение эпителиальных тканей, выражающееся в слущиваемости и ороговевании эпителия, в том числе и роговицы глаза, нарушение формирования скелета, торможение роста, уменьшение устойчивости к инфекциям (рис. 13.1).



Рис. 13.1. Схема зрительного цикла

Охарактеризуем зрительный цикл подробнее: на первом этапе *цис*-ретиаль в темноте соединяется с белком опсином, образуя родопсин; на втором под действием кванта света происходит фотоизомеризация 11-*цис*-ретиаля в *транс*-ретиаль; на третьем *транс*-ретиаль-опсин распадается на *транс*-ретиаль и опсин; поскольку пигменты встроены в мембраны светочувствительных пигментов сетчатки, то на четвертом этапе это приводит к местной деполяризации мембраны и возникновению нервного импульса, распространяющегося по нервному волокну; на пятом заключительном, этапе процесса идет регенерация исходного пигмента при участии ретиаль-изомеразы (*транс*-ретиаль – *транс*-ретинол – *цис*-ретинол – *цис*-ретиаль). В конце концов, *цис*-ретиаль соединяется с опсином, образуя родопсин.

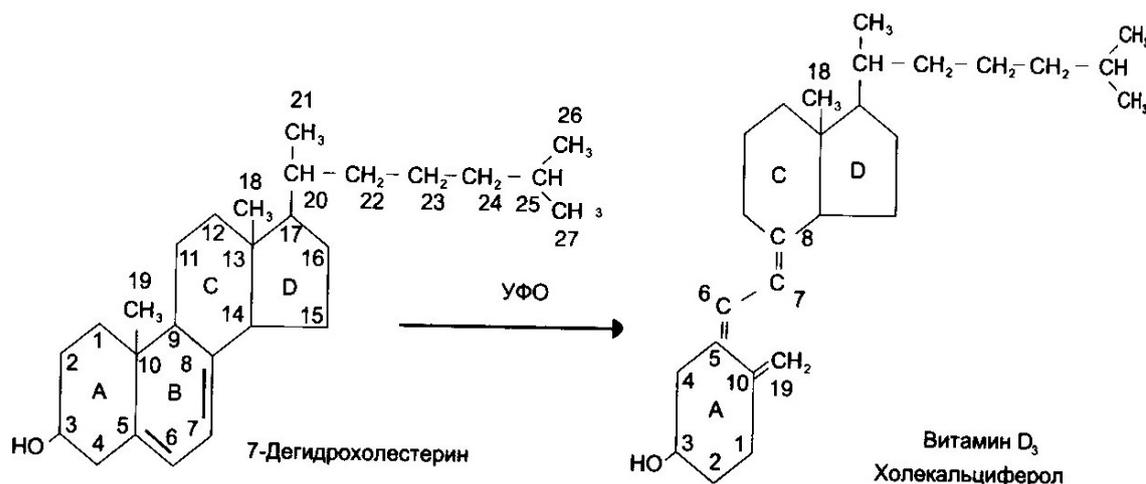
Ранним признаком гиповитаминоза витамина А служит снижение скорости адаптации к темноте. Недостаток витамина А сказывается и на развитии растений, на нормальное прорастание пыльцы. Хорошо изучена роль витамина А в фоторецепции. Попадающий на сетчатку свет адсорбируется и трансформируется пигментами сетчатки в другую форму энергии. У человека сетчатка содержит 2 типа рецепторных клеток: палочки и колбочки.

Палочки реагируют на слабое (сумеречное) освещение, а колбочки – на хорошее освещение (дневное). Палочки содержат зрительный пигмент родопсин, колбочки – йодопсин. Оба пигмента – сложные белки, отличающиеся своей белковой частью. В качестве кофермента оба белка содержат 11-*цис*-ретиаль – альдегидное производное витамина А.

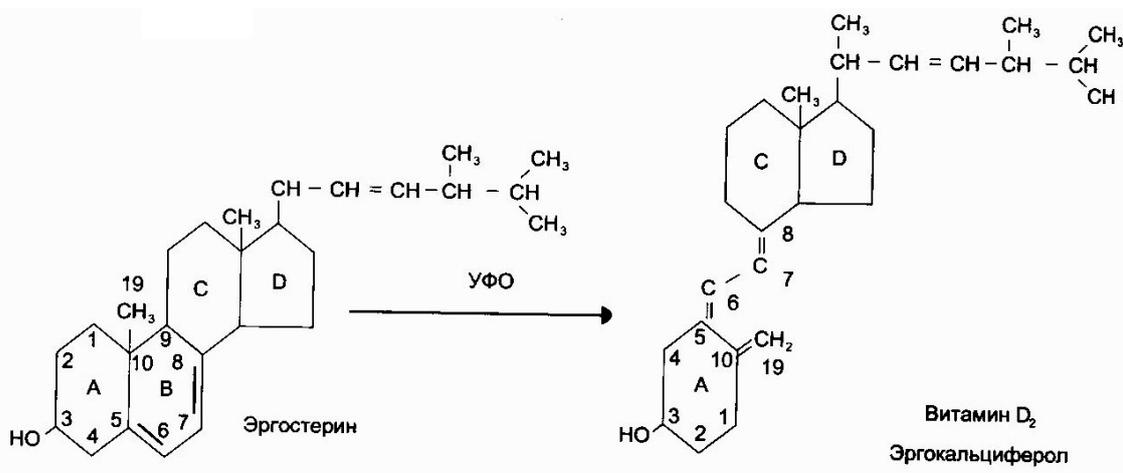
Ретиноевая кислота, подобно стероидным гормонам, взаимодействует с рецепторами в ядре клеток мишеней. Образовавшийся комплекс связывается с определенным участком ДНК и стимулирует транскрипцию генов. Белки, образовавшиеся в результате экспрессии генов, влияют на рост, дифференцировку, репродукцию и эмбриональное развитие.

Витамин D (кальциферол)

Кальциферолы – группа химически родственных соединений, относящихся к производным стероидов. Наиболее биологически активные витамины – D₂ и D₃. Витамин D₂ (эргокальциферол), производное эргостерина – растительного стероида, встречающегося в некоторых грибах, дрожжах и растительных маслах.



При УФ-облучении пищевых продуктов из эргостерина получается витамин D₂, используемый в лечебных целях. Витамин D₃, имеющийся у человека и животных, – холекальциферол, образующийся в коже человека из 7-дегидрохолестерина под действием УФ-лучей. Наибольшее количество витамина D₃ содержится в продуктах животного происхождения: сливочном масле, желтке яиц, рыбьем жире.



Суточная потребность для детей 12-25 мкг (500-1000 МЕ), для взрослого человека потребность значительно меньше.

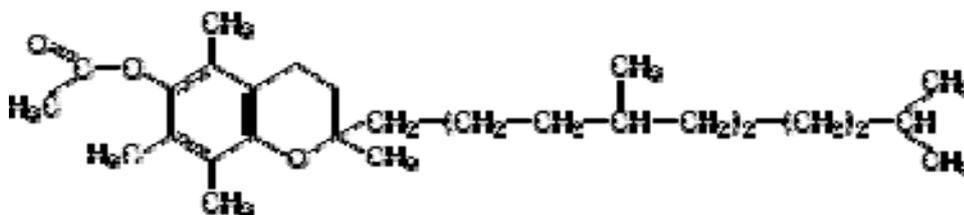
В организме человека витамин D₃ гидроксيليруется в положениях 25 и 1, превращаясь в биологически активное соединение 1,25-дигидрохолекальциферол (кальцитриол). Кальцитриол выполняет гормональную функцию, участвуя в регуляции обмена Ca²⁺ и фосфатов, стимулируя всасывание Ca²⁺ в кишечнике и кальцификацию костной ткани, реабсорбцию Ca²⁺ и фосфатов в почках. При низкой концентрации Ca²⁺ или высокой концентрации D₃ он стимулирует мобилизацию Ca²⁺ из костей.

При недостатке витамина D у детей развивается заболевание «рахит», характеризующееся нарушением кальцификации растущих костей, что вызывает деформацию скелета с характерными изменениями костей (X- или O-

образная форма ног, «четки» на ребрах, деформация костей черепа, задержка прорезания зубов). Избыточное поступление витамина D₃ приводит к гипервитаминозному состоянию, характеризующемуся избыточным отложением солей кальция в тканях лёгких, почек, сердца, стенок сосудов, а также остеопорозом с частыми переломами костей.

Витамин Е (токоферол)

Токоферол существует в виде нескольких витамеров. Семейство токоферолов и токотриелов являются метильными производными соединения токола. Наибольшую биологическую активность проявляет α-токоферол. Это соединение оптически активно, легко образует эфиры с органическими кислотами. Токоферолы отличаются высокой устойчивостью и выдерживают нагревание до 170°C, а эфиры токоферола ещё более устойчивы, чем свободные.

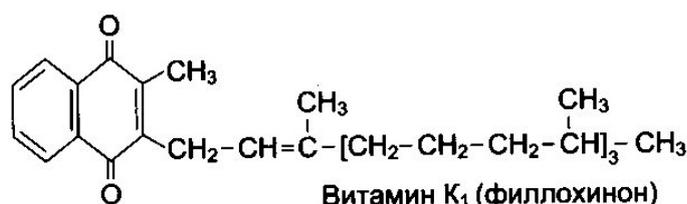


Под действием УФ-лучей витамин Е разрушается и теряет свои витаминные свойства. Источником витамина Е для человека являются растительные масла, салат, капуста, семена злаков, сливочное масло, ягоды шиповника, яичный желток. Суточная потребность в витамине у взрослого человека составляет, по разным рекомендациям от 5 до 10 мг. Е-авитаминозы и Е-гиповитаминозы – явление редкое, тем более что витамин Е откладывается во многих тканях и может использоваться из этих депо при отсутствии его в пище.

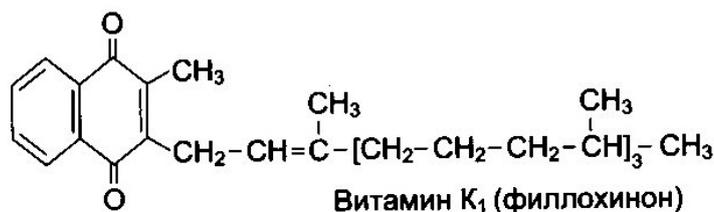
Долгое время считалось, что значение витамина Е исчерпывается лишь его влиянием на процессы размножения, т. к. при отсутствии или недостатке витамина Е у человека и животных нарушается сперматогенез и эмбриогенез, а также наблюдаются дегенеративные изменения репродуктивных органов. В настоящее время витамину Е уделяется большое внимание как антиоксиданту, который ингибирует свободнорадикальные процессы в клетке и, таким образом препятствует развитию цепных реакций перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот, защищает молекулы ДНК от повреждений. Токоферол предотвращает окисление боковой цепи витамина А. Клиническое проявление недостаточности витамина Е выражается в повторяющихся непроизвольных абортах, некоторых формах мышечной дистрофии, дегенерации спинного мозга, жировом перерождении печени, гемолитической анемии у детей.

Витамин К (нафтохинон)

Витамин К в природе существует в двух витаминных формах: филлохинон (К₁), выделенный из растений и менахинон (К₂) в клетках кишечной флоры. По химической структуре витамин К₁ представляет собой 2-метил-1,4-нафтохинон, имеющий боковую алифатическую цепь в виде фитильного радикала, состоящую из двадцати атомов углерода и одной двойной связи.



Витамин К₁ отличается от витамина К₂ строением своей боковой цепи. Витамин К₁ оптически активен, неустойчив при нагревании и действии УФ-лучей.



Источником витамина К служат продукты растительного происхождения, к которым относятся: капуста, шпинат, корнеплоды. Источником витамина К также служит печень.

Суточная потребность в витамине К составляет 1-2 мг. Авитаминозное и гиповитаминозное состояние по витамину К часто развивается не из-за его недостаточного поступления с пищей, а из-за нарушений всасывания витамина в кишечнике.

Биологическая функция витамина К связана с его участием в процессе свертывания крови ([рис. 13.2](#)).

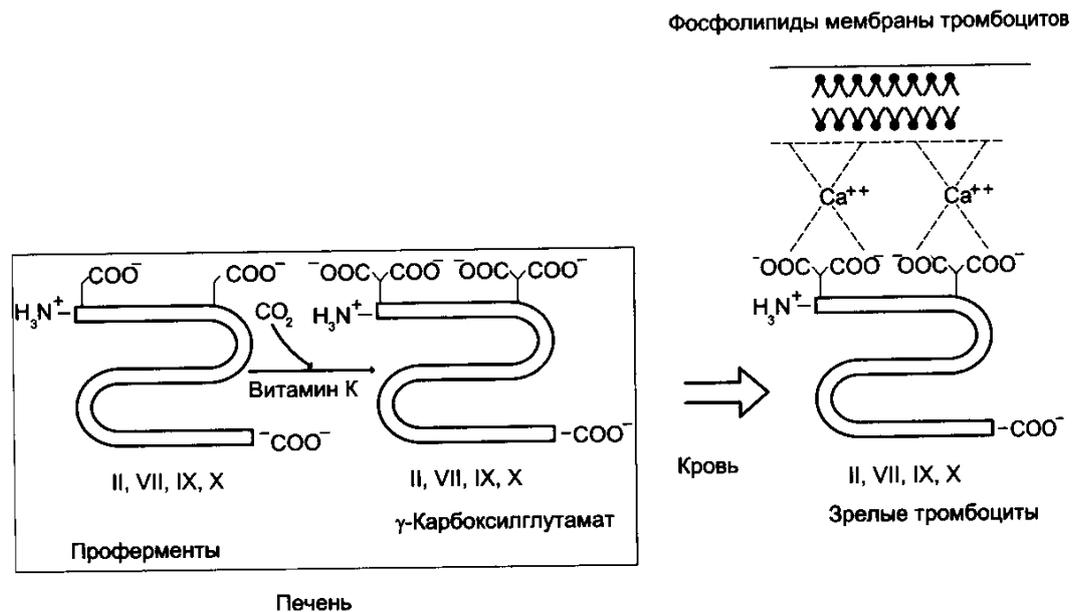


Рис. 13.2. Роль витамина К в свертывании крови

В этой многокомпонентной системе витамину К отведена роль активатора факторов свертывания крови, приводящих в конечном итоге к образованию тромбина.

Лекция 14

Ферменты – строение: свойства, механизм действия

Понятие о ферментах.

Сущность явлений ферментативного катализа

Основу – изнедательности любого организма составляют химические процессы. Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых *ферментами*, или *энзимами*. Среди множества энергетически возможных реакций ферменты избирательно преобразуют реагенты, называемые *субстратами*, по физиологически полезному пути. Таким образом, ферменты управляют всеми метаболическими процессами организма.

В настоящее время известно более 3700 ферментов. В научной литературе на русском языке утвердились оба термина («ферменты» и «энзимы»), но предпочтение отдают термину «фермент», хотя наука о ферментах называется энзимологией. Слово «фермент» происходит от *lat. fermentum* – закваска, слово – «энзим» от греч. *en* – в, внутри и *zyme* – дрожжи. Данная терминология возникла исторически при изучении ферментативных процессов спиртового брожения.

Становление энзимологии как науки произошло в начале XIX века. Её активное развитие продолжается и в настоящее время. В задачи этой науки

входят определение роли отдельных ферментов в ускорении химических реакций, протекающих в организме, выделение и очистка ферментов, установление их структуры, исследование механизма действия ферментов, изучение кинетических характеристик и особенностей регуляции активности *in vivo*.

Для практической медицины важность энзимологии обусловлена тем, что она даёт фармакологам инструмент направленного изменения метаболизма клетки путём воздействия определёнными химическими веществами на активность ферментов. Огромное количество фармацевтических препаратов – ингибиторы ферментов. Другая не менее важная задача энзимологии – использование методов определения активности ферментов в биологических жидкостях для диагностики заболеваний. Кроме того, выделенные и очищенные ферменты могут использоваться в качестве терапевтических средств.

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, однако имеет и отличительные свойства, связанные с особенностями строения ферментов.

Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что ферменты:

- 1) катализируют только энергетически возможные реакции, т.е. реакции, которые могут протекать и без них;
- 2) не изменяют направление реакции;
- 3) не сдвигают равновесие обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление;
- 4) не расходуются в процессе реакции и выходят из реакции в первоначальном виде.

Отличие ферментов от небиологических катализаторов заключается в том, что:

- 1) скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами (эффективность действия ферментов). Для большинства ферментов характерно то, что 1 молекула фермента может превратить от 1000 до 1 млн. молекул субстрата за 1 минуту. Эта скорость недостижима для небиологических катализаторов;
- 2) ферменты обладают высокой специфичностью действия;
- 3) ферменты катализируют реакции в очень мягких условиях (обычное давление, нейтральная pH, невысокая t°);
- 4) активность ферментов в клетках строго регулируется как на генетическом уровне, так и посредством определённых низкомолекулярных соединений (субстратов и продуктов реакции, катализируемых этими же ферментами);
- 5) скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента.

Структурная организация ферментов

В настоящее время получены неопровержимые экспериментальные доказательства белковой природы ферментов. Единственным исключением из этого положения является обнаружение у молекулы ряда предшественников РНК ферментативной активности, получившей название *рибозима* и катализирующей самосплайсинг, т. е. отщепление интронных нетранслируемых последовательностей от предшественника РНК.

Ферменты, как и все белки, обладают рядом свойств, характерных для высокомолекулярных соединений: амфотерностью, электрофоретической подвижностью и неспособностью к диализу через полупроницаемые мембраны. Подобно белкам, ферменты имеют большую молекулярную массу: от десятков тысяч до нескольких миллионов дальтон. Им присущи все особенности структурной организации белковых молекул (первичный, вторичный, третичный и четвертичный уровни организации).

В природе существуют как *простые*, так и *сложные ферменты* (рис. 14.1). Первые целиком представлены полипептидными цепями и при гидролизе распадаются исключительно на аминокислоты. Такими ферментами являются гидролитические ферменты, в частности пепсин, трипсин, папаин, уреазы, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др. Большинство природных ферментов относится к классу сложных белков, содержащих помимо полипептидных цепей какой-либо небелковый компонент (*кофактор*), присутствие которого является абсолютно необходимым для каталитической активности. Кофакторы могут иметь различную химическую природу и различаться по прочности связи с полипептидной цепью. Если константа диссоциации сложного фермента настолько мала, что в растворе все полипептидные цепи оказываются связанными со своими кофакторами и не разделяются при выделении и очистке, то такой фермент получает название *холофермента* (*холоэнзима*), а кофактор – название *простетической группы*, рассматриваемой как интегральная часть молекулы фермента (например, FAD, FMN, биотин, липоевая кислота). Полипептидную часть фермента принято называть *апоферментом*. Если же дополнительная группа легко отделяется от апофермента при диализе, в этом случае она называется *коферментом* (например, NAD^+ , NADP^+). Кроме этого, роль кофактора могут выполнять металлы: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и др.

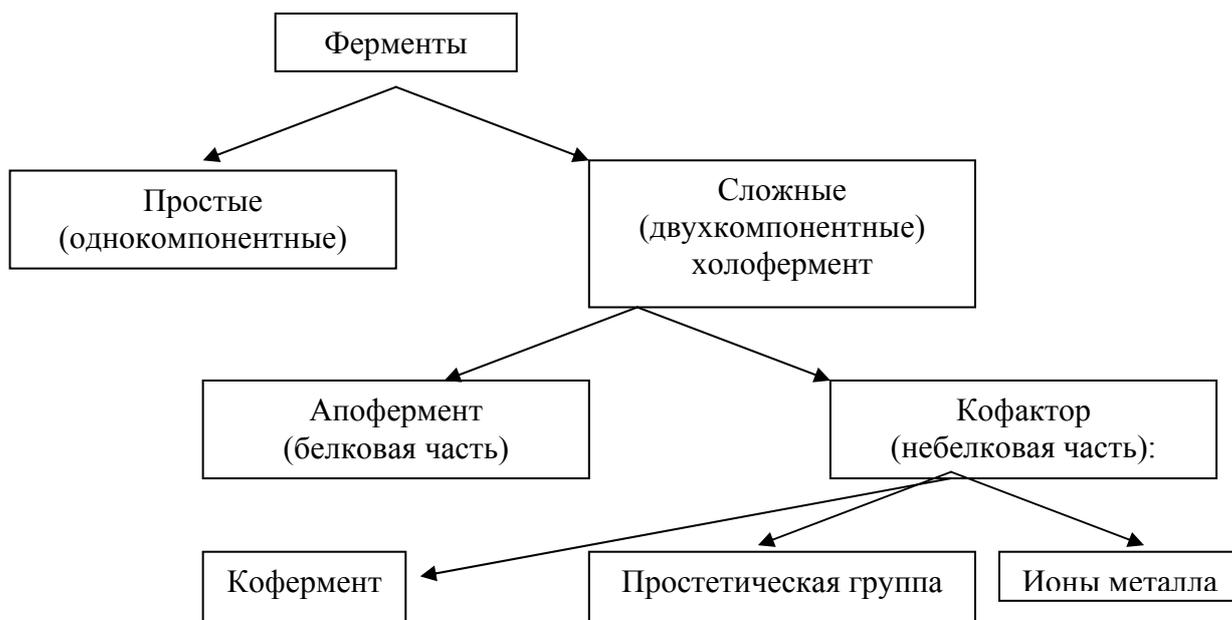


Рис. 14.1. Структура ферментов

Химическая природа кофакторов, их функции в ферментативных реакциях очень разнообразны. Согласно одной из классификаций все коферменты и простетические группы делят на 2 группы:

1. производные витаминов ([табл. 14.1](#));
2. невитаминные кофакторы.

Таблица 14.1

Важнейшие коферменты и простетические группы ферментов

Наименование	Участвующий витамин	Группы, подлежащие переносу
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD, NADF)	Никотинамид, витамин PP	Атомы водорода (электроны)
Флавиномононуклеотид, рибофлавинфосфат (FMN, FAD)	Рибофлавин, витамин B ₂	Атомы водорода (электроны)
Коэнзим А (CoA)	Пантотеновая кислота	Ацильные, ацетильные и др. группы
Тетрагидрофолиевая кислота (THF)	Фолиевая кислота	Метильные, метиленовые, формильные группы или фориминогруппы (одноуглеродные остатки)
Биоцитин	Биотин, витамин H	Двуокись углерода (активная форма CO ₂)

Окончание табл. 14.1

Тиаминдифосфат (TDP)	Тиамин, витамин В ₁	Альдегиды и кетоны
Пиридоксаль-5-фосфат (P5P)	Пиридоксин, витамин В ₆	Аминогруппы, карбоксильные группы
Дезоксиаденозил- и (метил)-кобаломин (В ₁₂ - коферменты)	Цианкоаломин, витамин В ₁₂	Атомы водорода, протоны и электроны

К невитаминным кофакторам относят следующие соединения: HС-глутатион, АТФ, липоевую кислоту, производные нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозинфосфосульфат), порфиринсодержащие вещества и др. К ним же могут быть отнесены тРНК, которые в составе ферментов аминоксил-тРНК-синтеаз принимают активное участие в транспортировке аминокислот в рибосому, где осуществляется синтез белка.

Следует отметить одну отличительную особенность двухкомпонентных ферментов: ни кофактор отдельно (включая большинство коферментов), ни сам по себе апофермент каталитической активностью не наделены, и только их объединение, протекающее не хаотично, а в соответствии с программой их структурной организации, обеспечивает быстрый ход химической реакции.

Более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Роль металлов в ферментативном катализе разнообразна.

1. Ионы металла выполняют функцию стабилизаторов молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур.

а) Ионы металлов – стабилизаторы молекулы субстрата

Для некоторых ферментов субстратом служит комплекс превращаемого вещества с ионом металла. Например, для большинства киназ в качестве одного из субстратов выступает не молекула АТФ, а комплекс Mg²⁺-АТФ. В этом случае ион Mg²⁺ не взаимодействует непосредственно с ферментом, а участвует в стабилизации молекулы АТФ и нейтрализации отрицательного заряда субстрата, что упрощает его присоединение к активному центру фермента (рис. 14.2).

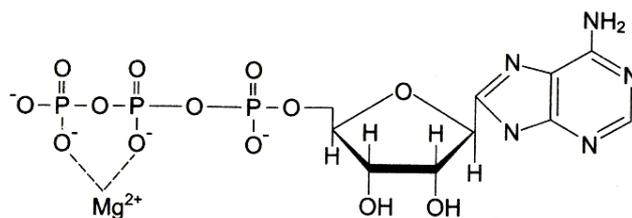


Рис. 14.2. Структура АТФ

Схематично роль кофактора при взаимодействии фермента и субстрата можно представить как комплекс E-S-Me, где E – фермент, S – субстрат, Me – ион металла. В качестве примера можно привести расположение субстратов в активном центре гексокиназы (рис. 14.3).

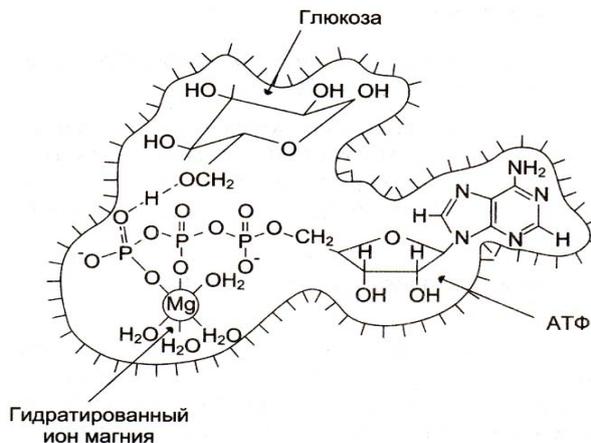


Рис. 14.3. Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре гексокиназы

В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса Mg²⁺-АТФ. Гексокиназа катализирует перенос концевой γ -фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата. Ион Mg²⁺ участвует в присоединении и «правильной» ориентации молекулы АТФ в активном центре фермента, ослабляя фосфоэфирную связь и облегчая перенос фосфата на глюкозу.

б) Ионы металла – стабилизаторы активного центра фермента

В некоторых случаях ионы металла служат «мостиком» между ферментом и субстратом. Они выполняют функцию стабилизаторов активного центра, упрощая присоединение к нему субстрата и протекание химической реакции. В ряде случаев ион металла может способствовать присоединению кофермента. Перечисленные выше функции выполняют такие металлы, как Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mo²⁺. В отсутствие металла эти ферменты активностью не обладают. Такие ферменты получили название «металлоэнзимы». Схематично данный процесс взаимодействия фермента, субстрата и металла можно представить следующим образом: E-Me-S.

К металлоэнзимам относят, например, пируваткиназу (рис. 14.4), катализирующую реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват.

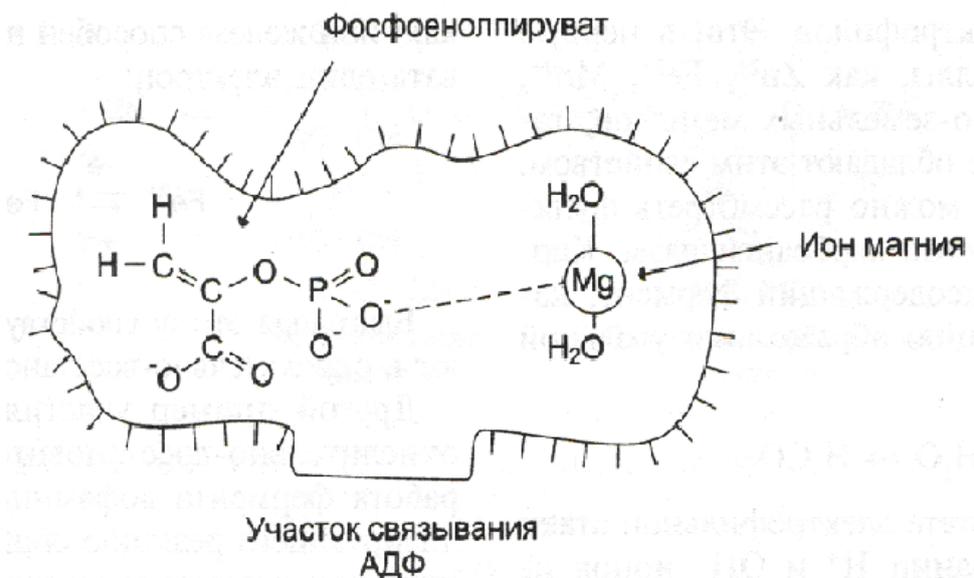


Рис. 14.4. Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре пируваткиназы

Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и ADP. Mg²⁺ участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоенолпирувата. В ходе ферментативной реакции образуется пируват и АТФ.

в) Ионы металлов – роль в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента

Ионы металлов обеспечивают сохранение вторичной, третичной, четвертичной структуры молекулы фермента. Такие ферменты в отсутствие ионов металлов способны к химическому катализу («металлоэнзимные комплексы»), однако они нестабильны. Их активность снижается и даже полностью исчезает при небольших изменениях pH, температуры и других незначительных изменениях параметров внешнего окружения. Таким образом, ионы металлов выполняют функцию стабилизаторов оптимальной конформации белковой молекулы.

Иногда в стабилизации вторичной и третичной структуры принимают участие ионы щелочноземельных металлов. Так, для поддержания третичной конформации пируваткиназы необходимы ионы K⁺.

Для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы, катализирующей реакцию окисления этанола, необходимы ионы цинка. Алкогольдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц с молекулярной массой 151 кДа. В состав фермента входят 4 атома Zn²⁺. Удаление Zn²⁺ приводит к потере активности фермента за счёт диссоциации на 4 неактивные субъединицы с молекулярной массой 36 кДа ([рис. 14.5](#)).

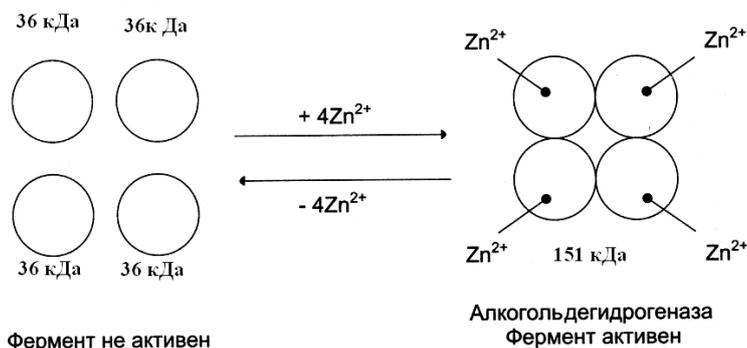


Рис. 14.5. Роль ионов цинка в стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы

2. Ионы металлов могут принимать непосредственное участие в акте катализа.

а) Участие в электрофильном катализе

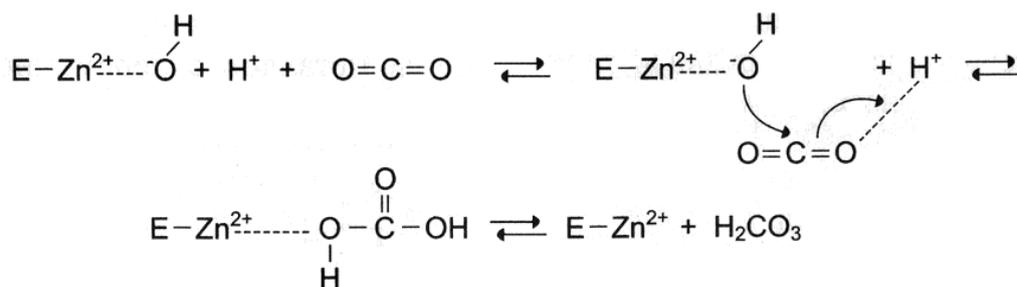
Наиболее часто эту функцию выполняют ионы металлов с переменной валентностью, имеющие свободную d-орбиталь и выступающие в качестве электрофилов. Это в первую очередь такие металлы, как Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} . Ионы щёлочноземельных металлов (такие как Na^+ и K^+), не обладают этим свойством. В качестве примера можно рассмотреть функционирование фермента карбоангидразы. Карбоангидраза – цинксодержащий фермент, катализирующий реакцию образования угольной кислоты:



Ион Zn^{2+} в результате электрофильной атаки участвует в образовании H^+ и OH^- ионов из молекулы воды:



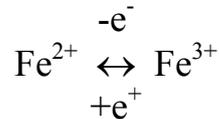
Протон и гидроксильная группа последовательно присоединяются к диоксиду углерода с образованием угольной кислоты:



В ходе электрофильного катализа ионы металлов часто участвуют в стабилизации промежуточных соединений.

б) Участие в окислительно-восстановительных реакциях

Ионы металлов с переменной валентностью могут также участвовать в переносе электронов. Например, в цитохромах (гемсодержащих белках) ион железа способен присоединять и отдавать один электрон:



Благодаря этому свойству цитохромы участвуют в окислительно-восстановительных реакциях.

3. Роль металлов в регуляции активности ферментов

Иногда ионы металлов выступают в роли регуляторных молекул. Например, ионы Ca^{2+} служат активаторами протеинкиназы С, катализирующей реакции фосфорилирования белков. Ионы Ca^{2+} также изменяют активность ряда кальций-кальмодулинзависимых ферментов.

Любой каталитический акт начинается с взаимодействия фермента и молекулы субстрата, то есть с тем веществом, на которое действует фермент. Участвующие в ферментативных реакциях молекулы субстратов часто имеют небольшие размеры по сравнению с молекулами ферментов. Поэтому было высказано предположение о том, что при образовании фермент-субстратных комплексов в непосредственный контакт с молекулой субстрата, очевидно, вступает ограниченная часть аминокислот пептидной цепи. Отсюда возникло представление об активном центре фермента.

Под *активным центром* подразумевают уникальную комбинацию аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающую непосредственное связывание ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа (рис. 14.6). Темные полосы на рисунке – участки полипептидной цепи фермента; R – аминокислотные остатки и их порядковые номера (с N-конца). Установлено, что у сложных ферментов в состав активного центра входят также простетические группы.

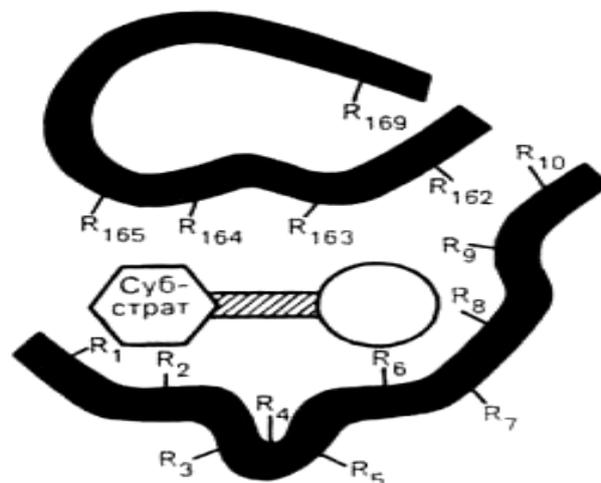


Рис. 14. 6. Активный центр фермента

Аминокислотные остатки (АО), формирующие активный центр, могут находиться в различных участках полипептидной цепи, однако, непременно должны быть сближены в пространстве. Такое сближение достигается благодаря трёхмерной структуре молекулы белка.

Предполагают, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка-фермента на рибосоме, когда линейная одномерная структура пептидной цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации. Образовавшийся белок приобретает информацию совершенно нового типа, а именно функциональную (в частности, каталитическую). Любые воздействия, приводящие к денатурации, т.е. нарушению третичной структуры, приводят к искажению или разрушению структуры активного центра и соответственно потере ферментом каталитических свойств. Если при подходящих внешних условиях удастся восстановить нативную трехмерную структуру белка-фермента (ренатурировать его), то восстанавливается и его каталитическая активность.

В активном центре условно различают так называемый *каталитический центр*, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и *связывающий центр*, или контактную («якорную») площадку, которая обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом. В свою очередь молекула субстрата также содержит функционально различные участки: например, субстраты эстераз или протеиназ – одну специфическую связь (или группу атомов), подвергающуюся атаке со стороны фермента, и один или несколько участков, избирательно связываемых ферментом ([рис. 14.7](#)).



Рис. 14.7. Структура активного центра молекулы химотрипсина

Обычно активный центр формируют 12-16 аминокислотных остатков, иногда их может быть больше. Кроме аминокислотных остатков, участвующих в формировании активного центра выделяют ещё два их типа: *вспомогательные*, которые находятся рядом с активным центром и влияют на его реакционную способность; *способствующие*, которые удалены АО, влияющие на конформацию всей молекулы фермента. Таким образом, от 1/2 до 2/3 всех АО ферментативного белка прямо или косвенно участвует в работе активного центра. Число активных центров в олигомерных ферментах может быть равно числу субъединиц, т. е. по одному активному центру на 1 субъединицу. Например, лактатдегидрогеназа состоит из четырёх субъединиц, каждая из которых имеет по активному центру. Активный центр может образовываться на месте контакта двух субъединиц. Тогда число активных центров будет меньше числа субъединиц.

Помимо активного центра в молекуле фермента может присутствовать также *аллостерический центр* (от греч. *allos* – другой, иной и *steros* – пространственный, структурный), представляющий собой участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества (эфффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются по структуре от субстратов. Иногда этих центров может быть несколько. Присоединение эфффектора к аллостерическому центру изменяет третичную и часто также четвертичную структуру молекулы фермента и соответственно конфигурацию активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности. Ферменты, активность каталитического центра которых изменяется под влиянием аллостерических эфффекторов, связывающихся с аллостерическим центром, получили название *аллостерических ферментов*.

Внутри клеток разных тканей и в самой клетке ферменты распределены неодинаково. Впервые это показал О. Варбург, который в 1913 г. определил, что процесс клеточного дыхания связан с осаждаемыми внутриклеточными частицами. Развитие метода дифференциального ультрацентрифугирования

ускорило изучение внутриклеточной локализации ферментов. Биохимический анализ отдельных клеточных фракций показал, что ферменты расположены в различных органеллах соответственно их функции в обмене веществ (табл. 14.2).

В цитозоле (растворимая фракция) содержатся ферменты гликолиза, пентозофосфатного пути распада глюкозы, активации аминокислот, синтеза и распада гликогена, ферментный комплекс – синтетаза жирных кислот и др.

В митохондриях происходит большинство обменных процессов, которые обеспечивают энергией всю клетку. В них локализованы ферменты цикла Кребса, окислительного фосфорилирования, окисления жирных кислот, глутаматдегидрогеназа, синтетаза аминокислот и др.

Лизосомы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания. Содержат около 30 ферментов, главным образом гидролазы: рибонуклеазу, эстеразы, протеазы, Р-глюкуронидазу и др. Лизосомальные ферменты представляют интерес для медицины вследствие их участия в воспалительных процессах, повреждениях клеток, рассасывании ткани и некоторых наследственных метаболических заболеваниях.

Микросомальная фракция включает рибосомы и эндоплазматический ретикулум, где содержатся ферменты синтеза белков, холинэстераза, церулоплазмин, глюкозо-6-фосфатаза, γ -глутамилтранспептидаза, ферменты конъюгации и др.

В ядре предположительно около 40 ферментов, в число которых входят репликативный комплекс, РНК-полимераза и, по-видимому, NAD-синтетаза.

Клеточная (плазматическая) мембрана содержит ферменты транспорта веществ – транслоказы, аденилатциклазу, 5-нуклеотидазу и некоторые др.

Таблица 14.2

Локализация некоторых ферментов внутри клетки

Компартмент клетки	Ферменты
Цитозоль	амилаза, липаза панкреатическая, глицеро-3-фосфатдегидрогеназа, гистидаза, сорбитолдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, креатинкиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гликогенсинтетаза
Митохондрия	пируватдегидрогеназный комплекс, цитратсинтаза, малатдегидрогеназа, уроганиназа, глутаматдегидрогеназа, креатинкиназа, ацил-СоА-дегидрогеназа, δ -аминолевулинатсинтетаза, аспартатаминотрансфераза, пируваткиназа
Лизосомы	кислая фосфатаза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, гиалуронидаза, коллагеназа, β -глюкуронидаза, арилсульфатаза, кислая рибонуклеаза, кислая дезоксирибонуклеаза, катепсин, α -маннозидаза

Микросомы	глюкозо-6-фосфатаза, γ -глутамил транспептидаза, моноаминокси даза, церулоплазмин, глюкуронидтрансфераза
Ядро	ДНК-полимераза, ДНК-лигаза, топоизомераза, эндонуклеаза, РНК-полимераза, хеликаза, NAD-синтетаза
Клеточная мембрана	нуклеотидаза, щелочная фосфатаза, γ -глутамил транспептидаза, K^+, Na^+ -АТРаза, аденилатциклаза

Активность ряда ферментов обнаруживается одновременно в нескольких органеллах.

Изоферменты: биологическая роль

Изоферменты, или *изоэнзимы* – это множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по физическим и химическим свойствам, в частности по сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции (активности), электрофоретической подвижности или регуляторным свойствам.

В живой природе имеются ферменты, молекулы которых состоят из двух и более субъединиц, обладающих одинаковой или разной первичной, вторичной или третичной структурой. Субъединицы нередко называют протомерами, а объединенную олигомерную молекулу – *мультимером* (рис. 14.8, а-г).

Считают, что процесс олигомеризации придает субъединицам белков повышенную стабильность и устойчивость по отношению к действию денатурирующих агентов, включая нагревание, влияние протеиназ и др. Однако на нынешнем этапе знаний нельзя ответить однозначно на вопрос о существенности четвертичной структуры для каталитической активности ферментов, поскольку пока отсутствуют методы, позволяющие в «мягких» условиях разрушить лишь четвертичную структуру. Обычно применяемые методы жесткой обработки (экстремальные значения рН, высокие концентрации гуанидинхлорида или мочевины) приводят к разрушению не только четвертичной, но и вторичной, и третичной структур стабильного олигомерного фермента, протомеры которого оказываются денатурированными и, как следствие, лишены биологической активности.

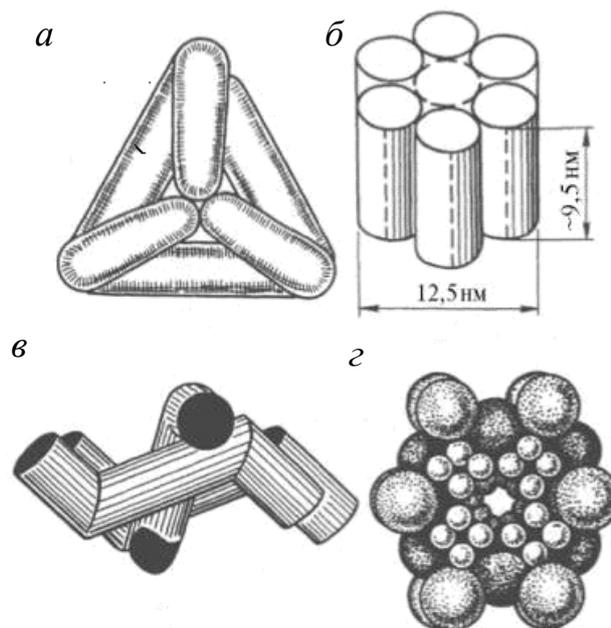


Рис. 14.8. Модели строения некоторых олигомерных ферментов: а – молекула глутаматдегидрогеназы, состоящая из 6 протомеров (336 кДа); б – молекула РНК-полимеразы; в – половина молекулы каталазы; г – молекулярный комплекс пируватдегидрогеназы

Следует указать на отсутствие ковалентных, главновалентных связей между субъединицами. Связи в основном являются нековалентными, поэтому такие ферменты довольно легко диссоциируют на протомеры. Удивительной особенностью таких ферментов является зависимость активности всего комплекса от способа упаковки отдельных субъединиц. Если *генетически различимые субъединицы* могут существовать более чем в одной форме, то соответственно и фермент, образованный из двух или нескольких типов субъединиц, сочетающихся в разных количественных пропорциях, может существовать в нескольких сходных, но не одинаковых формах. Подобные разновидности фермента получили название *изоферментов (изоэнзимов* или, реже, *изозимов*).

Одним из наиболее изученных ферментов, множественность форм которого детально изучена методом гель-электрофореза, является лактатдегидрогеназа (ЛДГ), катализирующая обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную. Она может состоять из четырех субъединиц двух разных Н- и М- типов (сердечный и мышечный). Активный фермент представляет собой одну из следующих комбинаций: НННН, НННМ, ННММ, НМММ, ММММ или Н₄, Н₃М, Н₂М₂, НМ₃, М₄. Они соответствуют изоферментам ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄, и ЛДГ₅. При этом синтез Н- и М-типов осуществляется различными генами и в разных органах экспрессируется по-разному.

Поскольку Н-протомеры при рН 7,0-9,0 несут более выраженный отрицательный заряд, чем М-протомеры, то изофермент Н₄ при электрофорезе

будет мигрировать с наибольшей скоростью в электрическом поле к положительному электроду (аноду). С наименьшей скоростью будет продвигаться к аноду изофермент M_4 , в то время как остальные изоферменты будут занимать промежуточные позиции (рис. 14.9).



Рис. 14.9. Распределение и относительное количество изоферментов ЛДГ в различных органах

Для каждой ткани в норме характерно свое соотношение форм (изоферментный спектр) ЛДГ. Например, в сердечной мышце преобладает тип H_4 , т. е. ЛДГ₁, а в скелетных мышцах и печени – тип M_4 , т.е. ЛДГ₅.

Эти обстоятельства широко используют в клинической практике, поскольку изучение появления изоферментов ЛДГ (и ряда других ферментов) в сыворотке крови может представлять интерес для дифференциальной диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей. По изменению содержания изоферментов в сыворотке крови можно судить как о топографии патологического процесса, так и о степени поражения органа или ткани.

В одних случаях субъединицы имеют почти идентичную структуру и каждая содержит каталитически активный участок (например, β -галактозидаза, состоящая из четырёх субъединиц). В других случаях субъединицы оказываются неидентичными. Примером последних может служить триптофансинтаза, состоящая из двух субъединиц, каждая из которых наделена собственной (но не основной) энзиматической активностью, однако, только будучи объединенными в макромолекулярную структуру, обе субъединицы проявляют триптофансинтазную активность.

Термин «множественные формы фермента» применим к белкам, катализирующим одну и ту же реакцию и встречающимся в природе в организмах одного вида. Термин «изофермент» применим только к тем множественным формам ферментов, которые появляются вследствие генетически обусловленных различий в первичной структуре белка (но не к формам, образовавшимся в результате модификации одной первичной последовательности).

Механизм действия ферментов

В 1903 г. В. Генри сделал вывод о том, что необходимой стадией ферментативного катализа является соединение фермента с субстратом, в результате чего образуется фермент-субстратный комплекс. Развитие этой идеи привело к созданию общей теории действия ферментов; особенно большой вклад в неё в 1913г. внесли Л. Михаэлис и М. Ментен. Согласно их гипотезе процесс ферментативного катализа можно разделить на три стадии:

- 1) диффузия субстрата к ферменту и стерическое связывание его с активным центром фермента, т.е. образование фермент-субстратного комплекса (ES);
- 2) преобразование первичного комплекса в один или несколько активированных фермент-субстратных комплексов (ES*, ES**...);
- 3) отделение продуктов (P) реакции от активного центра и диффузия его в окружающую среду.



Первая стадия обычно непродолжительна и зависит от концентрации субстрата в среде, а также его диффузии к активному центру фермента. Комплекс образуется практически мгновенно. Субстрат присоединяется к активному центру в нескольких точках, образуя хелатные (клешневидные) комплексы. Присоединение осуществляется связями разного характера, в основном слабыми (водородные, электростатические, гидрофобные, координационные), ковалентные связи встречаются редко. На этой стадии изменение энергии активации незначительно, ориентация субстрата и активного центра способствует их сближению и прохождению реакции.

Вторая стадия наиболее медленная и лимитирует скорость всего катализа в целом. Её длительность зависит от энергии активации данной химической реакции. На этой стадии происходит расшатывание связей субстрата, их разрыв или образование новых связей в результате взаимодействия с активными группами фермента. Благодаря образованию активированных переходных комплексов снижается энергия активации реакции.

Третья стадия практически мгновенна. Она определяется скоростью диффузии продуктов реакции в окружающую среду.

Ферменты – истинные катализаторы. Они значительно повышают скорость строго определённых химических реакций, которые в отсутствие ферментов протекают очень медленно. Ферменты не могут влиять на положение равновесия ускоряемых реакций; при этом в ходе реакций они не расходуются и не претерпевают необратимых изменений.

Ферменты с термодинамической точки зрения ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации. *Энергией активации* называется энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активи-

рованное (переходное) состояние при данной температуре. Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне (рис. 14.10).

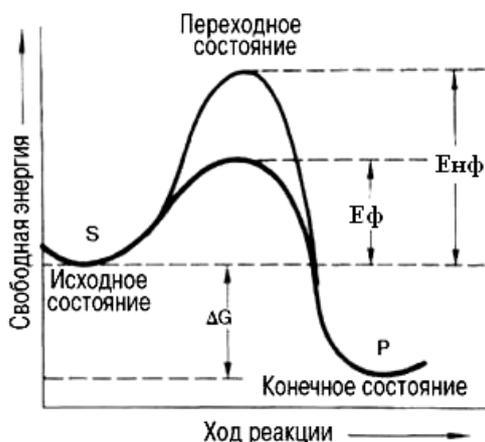


Рис. 14.10. Энергетический механизм ферментативной и неферментативной химических реакций: S – исходный субстрат; P – продукт; $\Delta E_{нф}$ – энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ – энергия активации ферментативной реакции; ΔG – стандартное изменение свободной энергии

Существует два основных пути повышения скорости химической реакции. Первый путь – повышение температуры, т.е. ускорение теплового движения молекул, которое приводит к увеличению доли молекул, обладающих достаточной энергией для достижения переходного состояния. В этой точке существует равная вероятность того, что достигшие её молекулы вступят в реакцию с образованием продукта или вернуться на уровень непрореагировавших молекул. Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии.

Второй путь – добавление катализатора. Они ускоряют химические реакции, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне. На промежуточной стадии реакции катализатор (C) взаимодействует с реагентом (A) с образованием нового комплекса CA, переходному состоянию которого соответствует значительно сниженная энергия активации по сравнению с переходным состоянием реагента A в некатализируемой реакции. Затем комплекс CA распадается на продукт (P) и свободный катализатор, который может опять соединиться с другой молекулой A и повторить весь цикл:



Существуют четыре основных фактора, определяющих способность ферментов ускорять химические реакции.

1. *Сближение и ориентация.* Фермент способен связывать молекулу субстрата таким образом, что атакуемая им связь оказывается не только рас-

положенной в непосредственной близости от каталитической группы, но и правильно ориентированной по отношению к ней. В результате вероятность того, что комплекс ES достигнет переходного состояния, сильно увеличивается (рис. 14.11).

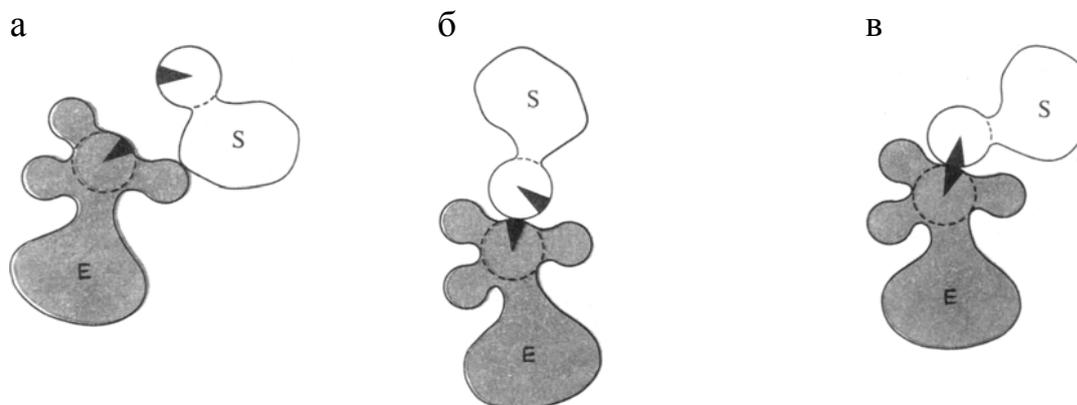


Рис. 14.11. Процессы сближения и ориентации при взаимодействии молекулы субстрата S с каталитической группой в активном центре фермента E: а – неправильная ориентация, неправильное сближение; б – правильное сближение, неправильная ориентация; в – правильное сближение, правильная ориентация

2. *Напряжение и деформация: индуцированное соответствие.* Присоединение субстрата может вызывать конформационные изменения в молекуле фермента, которые приводят к напряжению структуры активного центра, а также несколько деформируют связанный субстрат, упрощая тем самым достижение комплексом ES переходного состояния.

При этом возникает так называемое *индуцированное соответствие* фермента субстрату. Таким образом, небольшие изменения третичной или четвертичной структуры относительно крупной молекулы фермента могут играть роль механического рычага для молекулы субстрата. Возможно, именно по этой причине ферменты представляют собой белки и, следовательно, по своим размерам значительно превосходят молекулы большинства субстратов.

3. *Общий кислотнo-основнoй катализ.* В активном центре фермента могут находиться группы специфических аминокислотных остатков, которые являются хорошими донорами или акцепторами протонов (рис. 14.12). Такие кислотные или основные группы общего типа представляют собой мощные катализаторы многих органических реакций, протекающих в водных системах.

а

- COOH
- ⁺NH₃
- SH



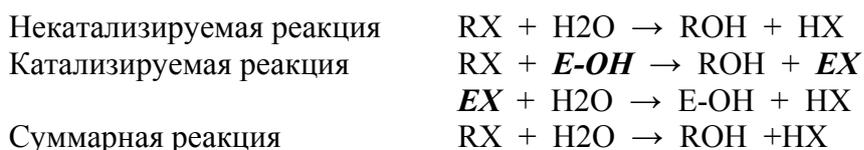
б

- COO⁻
- NH₂
- S⁻



Рис. 14.12. Функциональные группы аминокислотных остатков, принимающие участие в каталитических процессах: а – протон-донорные группы; б – протон-акцепторные группы

4. *Ковалентный катализ.* Некоторые ферменты реагируют со своими субстратами, образуя очень нестабильные, ковалентно связанные фермент-субстратные комплексы, из которых в ходе последующей реакции образуются продукты реакции, причем значительно быстрее, чем в случае некатализируемых реакций:



В некоторых ферментативных реакциях фермент замещает функциональную группу R в субстрате RX, в результате чего образуется ковалентный комплекс EX. Он нестабилен и гидролизуеться значительно быстрее, чем RX. К ферментам, осуществляющим ковалентный катализ, относится химотрипсин.

Перечисленные выше факторы, по-видимому, в различной степени ускоряют химические реакции. Однако для многих ферментов пока не известно точного механизма, обеспечивающего ускорение той или иной специфической реакции.

Специфичность действия ферментов

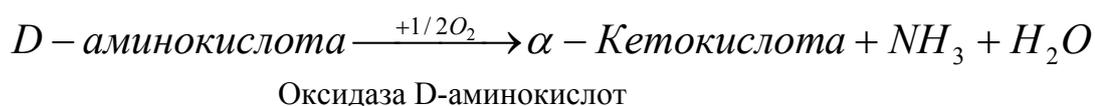
Ферменты обладают высокой специфичностью действия. Это свойство существенно отличает их от неорганических катализаторов. Высокая специфичность ферментов обусловлена конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурной организацией активного центра, что обеспечивает «узнавание», высокое сродство и избирательность протекания одной какой-либо реакции из тысячи других, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

В зависимости от механизма действия различают три вида *специфичности* действия ферментов.

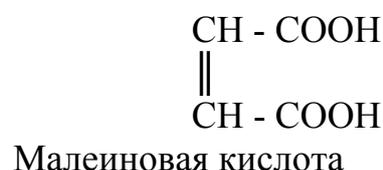
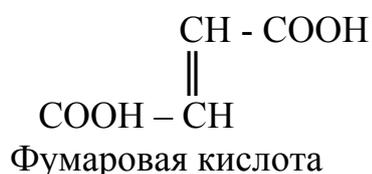
Относительной (или *групповой*) специфичностью обладают большинство ферментов, участвующих в процессе пищеварения. Так, для действия некоторых гидролитических ферментов наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Например, пепсин *в одинаковой степени расщепляет белки животного и растительного происхождения не смотря* на то, что эти белки существенно отличаются как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет ни углеводы, ни жиры. Объясняется это тем, что точкой приложения действия пепсина является пептидная связь.

Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Любые изменения (модификации) в структуре субстрата делают его недоступным для действия фермента. Примерами таких ферментов могут служить аргиназа, расщепляющая в естественных условиях (в организме) аргинин, уреазы, катализирующие распад мочевины, и др.

Имеются экспериментальные доказательства существования так называемой *стереохимической* специфичности, обусловленной существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических *цис*-и *транс*-изомеров химических веществ. Так, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-аминокислоты. Каждый из видов оксидаз действует только на свой специфический стереоизомер:



Если какое-либо соединение существует в форме *цис*-и *транс*-изомеров с различным расположением групп атомов вокруг двойной связи, то, как правило, только один из этих геометрических изомеров может служить в качестве субстрата для действия фермента. Например, фумараза катализирует превращение только фумаровой кислоты (*транс*-изомер), но не действует на малеиновую кислоту (*цис*-изомер):



Таким образом, благодаря высокой специфичности действия ферменты обеспечивают протекание с большой скоростью лишь определенных химических реакций из огромного разнообразия возможных превращений в микропространстве клеток и всем организме, регулируя интенсивность обмена веществ.

В 1890 г. Фишер (Fischer) высказал предположение о том, что высокая специфичность действия ферментов обуславливается особой формой молекулы фермента, точно соответствующей форме молекулы субстрата (или субстратов). Эту гипотезу часто называют гипотезой «ключа и замка»: в ней субстрат сравнивается с «ключом», который точно подходит по форме к «замку», т. е. к ферменту ([рис. 14.13](#)).

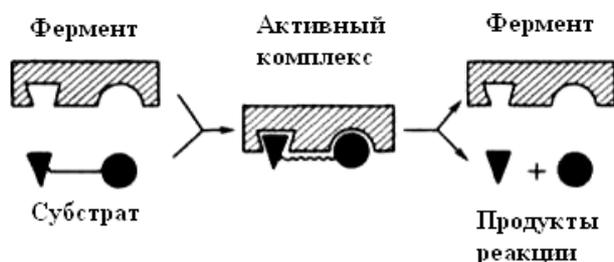


Рис. 14.13. Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок»

Фермент-субстратный комплекс – это активированное состояние, ведущее к образованию продуктов реакции. Образовавшиеся продукты по форме уже не соответствуют активному центру. Они отделяются от него (поступают в окружающую среду), после чего освободившийся активный центр может принимать новые молекулы субстрата.

В 1959 г. новую интерпретацию гипотезы «ключа и замка» предложил Д. Кошланд. На основании данных, позволявших считать ферменты и их активные центры физически более гибкими, чем это казалось вначале, он предложил идею о динамическом взаимодействии между ферментом и субстратом. Согласно этому представлению субстрат, соединяясь с ферментом, вызывает изменения в структуре последнего. Аминокислотные остатки, составляющие активный центр фермента, принимают определенную форму, которая дает возможность ферменту наиболее эффективным образом выполнять свою функцию ([рис. 14.14](#)).

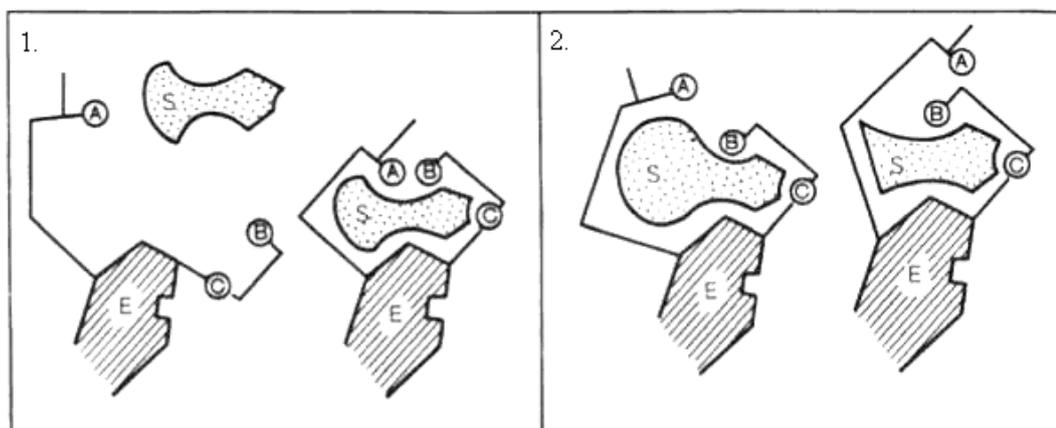


Рис. 14.14 Изменения структуры активного центра фермента, вызванные субстратом, согласно модели Д. Кошланда: 1 – активный комплекс; 2 – неактивный комплекс; А, В, С – функциональные группы активного центра

Эту гипотезу называют *гипотезой индуцированного соответствия*. Подходящей аналогией в этом случае может служить перчатка, которая при надевании на руку соответствующим образом изменяет свою форму. С выяснением отдельных деталей механизма различных реакций в эту гипотезу вносятся уточнения. Выяснилось, например, что молекулы субстрата в некоторых случаях несколько изменяют свою форму еще до того, как вступить в соединение с ферментом.

Стационарная кинетика ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций – раздел энзимологии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ, а также факторов окружающей среды. Чтобы понять и правильно оценить результаты определения ферментативной активности, нужно совершенно отчётливо представлять себе, от каких факторов зависит скорость реакции, какие условия оказывают влияние на неё. Таких условий много. Прежде всего, это соотношение концентраций самих реагирующих веществ: фермента и субстрата. Также важны условия, в которых протекает реакция: температура, кислотность, присутствие регуляторных молекул (активаторов и ингибиторов), солей и других примесей, способных как ускорить, так и замедлить ферментативный процесс, и т.д.

Концентрация субстрата

Одним из наиболее существенных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата (или субстратов) и продукта (продуктов). В случае постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума ([рис. 14.15](#)), при котором дальнейшее увеличение количества субстрата

практически не оказывает влияния на скорость ферментативной реакции. В таких случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен, т. е. все молекулы фермента связаны с субстратом. Фактором, ограничивающим скорость реакции, при этом становится концентрация фермента.



Рис. 14.15 График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента

Концентрация фермента

Скорость любой ферментативной реакции непосредственно зависит от концентрации фермента ([рис.14.16](#)). Линейная зависимость между этими величинами, когда скорость реакции прямо пропорциональна количеству присутствующего фермента, справедлива только в определенных условиях, например в начальный период ферментативной реакции, т. к. в этот период практически не происходит обратной реакции, а концентрация продукта оказывается недостаточной для обратимости реакции. Именно в этом случае скорость реакции (точнее, начальная скорость реакции v) будет пропорциональна концентрации фермента.

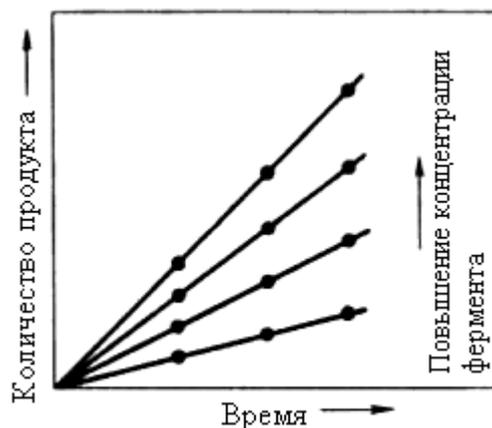


Рис. 14.16 Зависимость скорости реакции от концентрации фермента в присутствии избытка субстрата

Температура

Скорость химических реакций зависит и от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к её изменениям. Установлено, что скорость большинства биохимических реакций повышается в 2 раза при повышении температуры на 10°C и, наоборот, снижается в 2 раза при понижении температуры на 10°C . Этот показатель получил название *температурного коэффициента*. Однако вследствие белковой природы фермента тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. Так, при температуре, не превышающей $45-50^{\circ}\text{C}$, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше 50°C на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая денатурация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса (рис. 14.17).

Таким образом, термолабильность, или чувствительность к повышению температуры, является одним из характерных свойств ферментов, резко отличающих их от неорганических катализаторов. В присутствии последних скорость реакции возрастает экспоненциально при повышении температуры (кривая «а» на рис. 14.17). При температуре 100°C почти все ферменты утрачивают свою активность: Исключение составляет, очевидно, только один фермент мышечной ткани – миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100°C .

Оптимальной для действия большинства ферментов теплокровных животных является температура 40°C ; в этих условиях скорость реакции оказывается максимальной вследствие увеличения кинетической энергии реагирующих молекул. При низких температурах (0°C и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, хотя активность их падает почти до нуля.

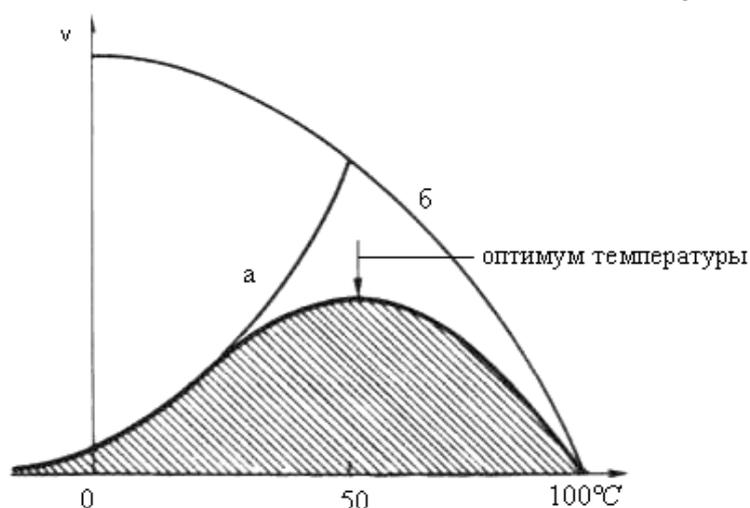


Рис. 14.17 Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры: а – повышение скорости реакции как функция температуры; б - снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента

Во всех случаях имеет значение время воздействия соответствующей температуры. Следует отметить, что на термоллабильность ферментов определенное влияние оказывают концентрация субстрата, величина рН среды и другие факторы.

Величина рН среды

Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям рН среды 6,0–8,0. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, в которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют *оптимумом рН* среды для действия данного фермента ([рис. 14.18](#)).

При определении зависимости активности фермента от концентрации водородных ионов реакцию проводят при разных значениях рН среды, обычно при оптимальной температуре и достаточно высокой (насыщающей) концентрации субстрата. В [табл. 14.3](#) приводятся оптимальные значения рН среды для ряда ферментов.

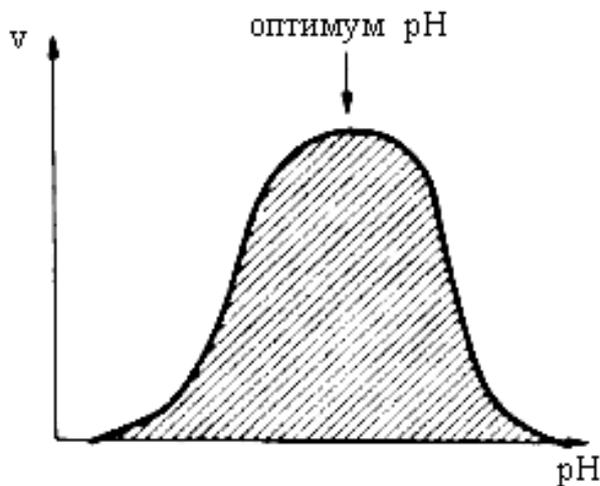


Рис. 14.18 Зависимость скорости реакции от значения рН

Из данных [табл. 14.3](#) видно, что рН-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляет пепсин, рН-оптимум которого 2,0 (при рН 6,0 он неактивен и нестабилен). Объясняется это, во-первых, структурной организацией молекулы фермента и, во-вторых, тем, что пепсин является компонентом желудочного сока, содержащего свободную соляную кислоту, которая создает оптимальную кислую среду для действия этого фермента. С другой стороны, рН-оптимум аргиназы лежит в сильнощелочной зоне (около 10,0); такой среды нет в клетках печени, следовательно, *in vivo* аргиназа функционирует, по-видимому, не в своей оптимальной зоне рН среды.

Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	pH	Фермент	pH
Пепсин	1,5-2,5	Каталаза	6,8-7,0
Катепсин В	4,5-5,0	Уреаза	7,0-7,2
Амилаза из солода	4,9-5,2	Липаза панкреатич.	7,0-8,5
Сахараза кишечная	5,8-6,2	Трипсин	7,5-8,5
Амилаза слюны	6,8-7,0	Аргиназа	9,5-10,0

Согласно современным представлениям влияние изменений pH среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (в частности, COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH₂-группы лизина и др.). При резких сдвигах от оптимума pH среды ферменты могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента. При разных значениях pH среды активный центр может находиться в частично ионизированной или неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно на формировании активного фермент-субстратного комплекса. Кроме того, имеет значение состояние ионизации субстратов и кофакторов.

Уравнение Михаэлиса-Ментен

Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать выяснению молекулярного механизма действия фермента.

Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям. Известно, что любая химическая реакция характеризуется константой термодинамического равновесия. Она выражает состояние химического равновесия, достигаемого системой, и обозначается K_p . Так, для реакции



константа равновесия равна произведению концентраций образующихся веществ, деленному на произведение концентрации исходных веществ. Значение константы равновесия обычно находят из соотношения констант скоростей прямой (k_{+1}) и обратной (k_{-1}) реакций, т.е. $K_p = k_{+1}/k_{-1}$. В состоянии равновесия скорость прямой реакции: $v_{+1} = k_{+1}[A] \cdot [B]$ равна скорости обратной реакции: $v_{-1} = k_{-1}[C] \cdot [D]$, т. е. $v_{+1} = v_{-1}$ соответственно $k_{+1}[A] \cdot [B] = k_{-1}[C] \cdot [D]$, или

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \times [B]}$$

Отсюда, $\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = Kp.$

Таким образом, константа равновесия равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакций. Величину, обратную константе равновесия, принято называть в случае ферментативной реакции *константой диссоциации фермент-субстратного комплекса*, и обозначать символом K_S . Так, в реакции



т.е. K_S равна отношению произведения концентрации фермента и субстрата к концентрации фермент-субстратного комплекса или отношению констант скоростей обратной и прямой реакций. Следует отметить, что константа K_S зависит от химической природы субстрата и фермента и определяет степень их сродства. Чем ниже значение K_S , тем выше сродство фермента к субстрату.

При изучении кинетики ферментативных реакций следует учитывать одну важную особенность этих реакций, не свойственную обычным химическим реакциям и связанную с явлением насыщения фермента субстратом. При низкой концентрации субстрата зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 14.19) является почти линейной и подчиняется кинетике первого порядка; б – реакция смешанного порядка; в – реакция нулевого порядка.



Рис. 14.19. График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента: а – реакция первого порядка; б – реакция смешанного порядка; в – реакция нулевого порядка

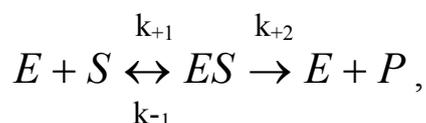
Это означает, что скорость реакции $S \rightarrow P$ прямо пропорциональна концентрации субстрата S и в любой момент времени t определяется следующим кинетическим уравнением:

$$V = -\frac{d[S]}{dt} = k'[S],$$

где $[S]$ – молярная концентрация субстрата; $-d[S]/dt$ – скорость убыли субстрата; k' – константа скорости реакции, которая в данном случае имеет размерность, обратную единице времени (мин^{-1} или с^{-1}).

При высокой концентрации субстрата скорость реакции максимальна, постоянна и не зависит от концентрации субстрата. В этом случае реакция подчиняется *кинетике нулевого порядка* $v = k''$ (при полном насыщении фермента субстратом) и целиком определяется концентрацией фермента. Кроме того, различают *реакции второго порядка*, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ. В определенных условиях при нарушении пропорциональности иногда говорят о *реакциях смешанного порядка* (см. [рис. 14.19](#)).

Изучая явление насыщения, Л. Михаэлис и М. Ментен разработали общую теорию ферментативной кинетики. Они исходили из предположения о том, что ферментативный процесс протекает в виде следующей химической реакции:



т.е. фермент E вступает во взаимодействие с субстратом S с образованием промежуточного комплекса ES , который далее распадается на свободный фермент и продукт реакции P . Принимая во внимание, что скорость ферментативной реакции определяется константой каталитического превращения фермент-субстратного комплекса (k_{+2}) и его концентрации, Михаэлис и Ментен предложили уравнение, выражающее количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции:

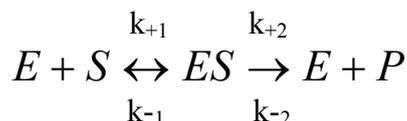
$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_S + [S]}$$

где v – наблюдаемая скорость реакции при данной концентрации субстрата; K_S – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, моль/л; V_{\max} – максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом.

Из уравнения Михаэлиса–Ментен следует, что при высокой концентрации субстрата и низком значении K_S скорость реакции является

максимальной, т.е. $v = V_{\max}$ (реакция нулевого порядка, см. [рис. 14.19](#)). При низкой концентрации субстрата, скорость реакции напротив, оказывается прямопропорциональной концентрации субстрата в каждый данный момент (*реакция первого порядка*).

Следует указать, что уравнение Михаэлиса-Ментен в его классическом виде не учитывает влияние на скорость ферментативного процесса продуктов реакции и носит несколько ограниченный характер.



В связи с этим были предприняты попытки усовершенствовать уравнение, что было сделано Бриггсом и Холдейном:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

где K_m - константа Михаэлиса, являющаяся экспериментально определяемой величиной. Она может быть представлена следующим уравнением:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \text{ или } K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} + \frac{k_{-1}}{k_{+1}}.$$

В числителе – константы скоростей распада комплекса ES в двух направлениях (в сторону исходных E и S и в сторону конечных продуктов реакции E и P). Отношение k_{-1}/k_{+1} представляет собой константу диссоциации фермент-субстратного комплекса K_S . Тогда

$$K_m = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$

Отсюда вытекает важное следствие: константа Михаэлиса всегда больше константы диссоциации фермент-субстратного комплекса K_S на величину k_{+2}/k_{+1} .

Для определения численного значения K_m обычно находят ту концентрацию субстрата, при которой скорость ферментативной реакции v составляет половину от максимальной V_{\max} , т.е. если $v = 1/2 V_{\max}$. Подставив значение v в уравнение Бриггса–Холдейна, получаем:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Разделив обе части уравнения на V_{\max} , получим:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

откуда $K_m = [S]$

Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции составляет половину от максимальной.

Определение величины K_m имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов и т.д. Константу Михаэлиса можно вычислить по графику (рис. 14.20).

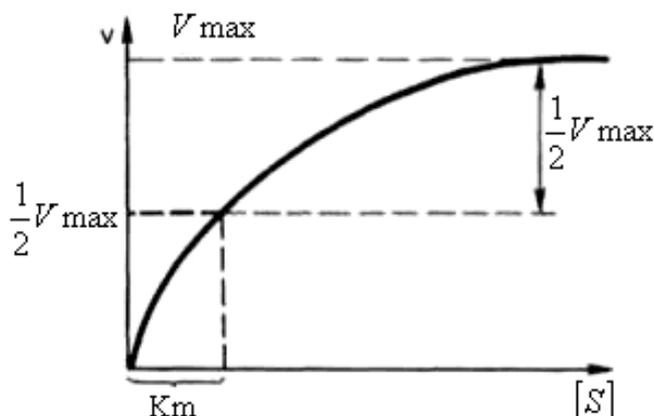


Рис. 14.20. Гиперболическая зависимость начальной скорости катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата (график уравнения Михаэлиса-Ментен)

Отрезок на абсциссе, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой K_m .

Единицы ферментов

Определение количественного содержания ферментов в биологических объектах представляет известные трудности поскольку, за редким исключением ферменты в тканях присутствуют в ничтожно малых концентрациях. Поэтому о количестве ферментов судят по скорости катализируемой реакции в определенных, согласованных условиях измерения. При оптимальных условиях температуры, рН среды и полном насыщении фермента субстратом *скорость катализируемой реакции пропорциональна концентрации фермен-*

та. О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования продукта реакции. Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U): за единицу активности любого фермента принимается то его количество, которое в оптимальных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата или образование одного микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин). Единицы активности фермента выражают также в наномолях (10^{-9} моль) и пикомолях (10^{-12} моль).

В связи с введением Международной системы единиц (СИ) предложено новое выражение активности фермента в каталах (кат, kat): 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль в 1 с (1 моль/с). Отношение международной единицы (U) к каталу можно выразить следующим образом: $1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \cdot \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$, или $1 \text{ U} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = 1/60 \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = 1/60 \text{ мккат} = 16,67 \text{ нкат}$. Таким образом, 1 U фермента соответствует 16,67 нкат.

Кроме того, рекомендовано измерять активность фермента при температуре 25°C , оптимуме pH и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения. В этих случаях скорость соответствует нулевому порядку реакции в отношении субстрата и зависит только от концентрации фермента.

В практике для выражения активности часто пользуются произвольными понятиями удельной и молярной активности. Удельную активность фермента принято выражать числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка (или числом каталов на 1 кг активного белка). Количество молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в продукт в процессе реакции в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом, принято называть числом оборотов фермента, или молярной активностью (молярная каталитическая активность выражается в каталах на 1 г/моль фермента). Так, одна молекула каталазы эритроцитов способна, например, расщепить в одну секунду 44000 молекул перекиси водорода. В то же время для того, чтобы 1 атом неорганического железа, также катализирующий распад H_2O_2 , расщепил такое число молекул H_2O_2 , которое расщепляет каталаза в одну секунду, потребовалось бы несколько лет. Этот пример является наглядным доказательством одного из главных свойств ферментов – их высокой каталитической активности.

Лекция 15

Регуляция ферментативной активности. Классификация ферментов

Активирование и ингибирование ферментов

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется также присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые снижают её.

Активаторы ферментов

Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Так, соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока; желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы; некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназа), растительная протеиназа и др. в значительной степени активируются соединениями, содержащими свободные SH-группы (глутатион, цистеин), а ряд ферментов – также витамином С. Особенно часто активаторами выступают ионы двухвалентных, реже – одновалентных металлов (см. лекцию 14). Получены доказательства того, что около четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов. Многие ферменты вообще не активны в отсутствие металлов. Так, при удалении цинка угольная ангидраза (карбоангидраза), катализирующая биосинтез и распад H_2CO_3 , практически теряет свою ферментативную активность; более того, цинк при этом не может быть заменен никаким другим металлом. Известны ферменты, действие которых активируется ионами нескольких металлов; в частности, енолаза активируется Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ .

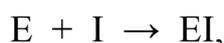
Ингибиторы ферментов

Ингибиторы ферментов – это вещества, вызывающие частичное (обратимое) или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Ингибиторы обычно принято делить на два больших класса: *обратимые* и *необратимые*.

Исследование ингибиторов ферментов имеет важное значение. Например, при помощи ингибиторов, выключающих отдельные стадии многоступенчатого метаболического процесса, может быть точно установлена не только последовательность химических реакций, но и природа участвующих в этих превращениях ферментов. Этим путем (с применением йодацетата, фторидов и других специфических ингибиторов) был расшифрован гликолитический путь окислительно-восстановительных превращений глюкозы до стадии образования молочной кислоты в мышечной ткани, насчитывающий 11 стадий (с участием одиннадцати ферментов и десяти промежуточных ме-

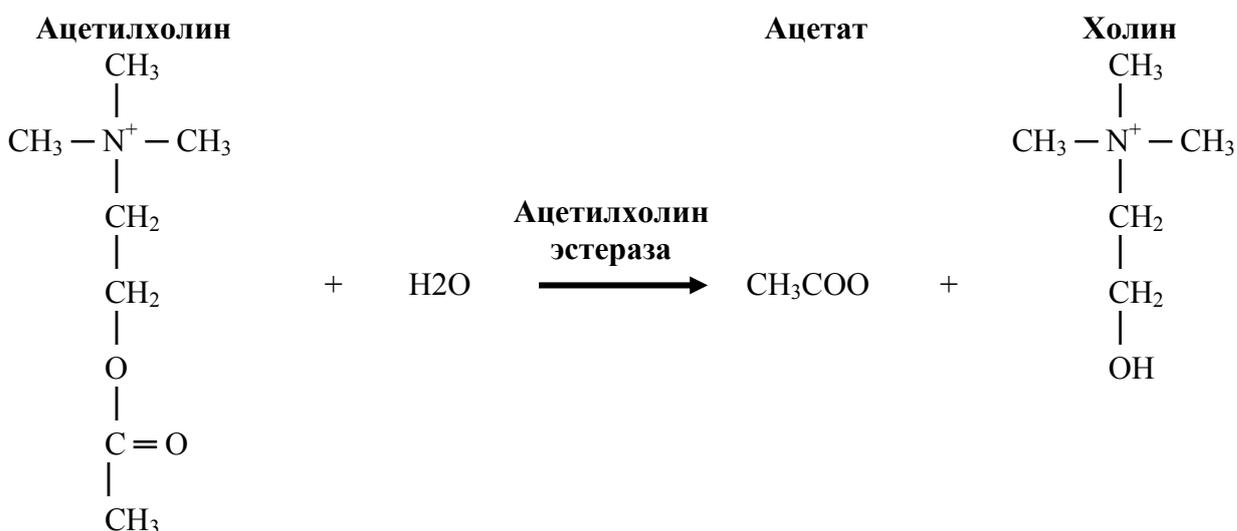
таболитов). Кроме того, механизм действия некоторых лекарственных препаратов состоит именно в том, что они ингибируют определённые ферменты в клетках с нарушенными функциями.

Если ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп, такой тип ингибирования называется *необратимым*. Необратимое действие ингибитора в самом простом случае может быть описано уравнением



где E – фермент; I – ингибитор; EI – ферментингибиторный комплекс.

Примером необратимого ингибирования является действие йодацетата, диизопропилфторфосфата (ДФФ), а также диэтил-*n*-нитрофенилфосфата и солей синильной кислоты. Это действие заключается в связывании и выключении функциональных групп или ионов металлов в молекуле фермента. Так, например, ДФФ – соединение из группы нервнопаралитических отравляющих веществ – связываясь с остатком аминокислоты серина, находящимся в активном центре фермента *ацетилхолинэстеразы*, образует ферментингибиторный комплекс. Этот фермент инактивирует ацетилхолин, играющий роль нейромедиатора. Одна из функций ацетилхолина заключается в передаче нервного импульса от одного нейрона к другому через синаптическую щель. Почти сразу после передачи очередного импульса ацетилхолинэстераза инактивирует ацетилхолин, расщепляя его на холин и уксусную кислоту:

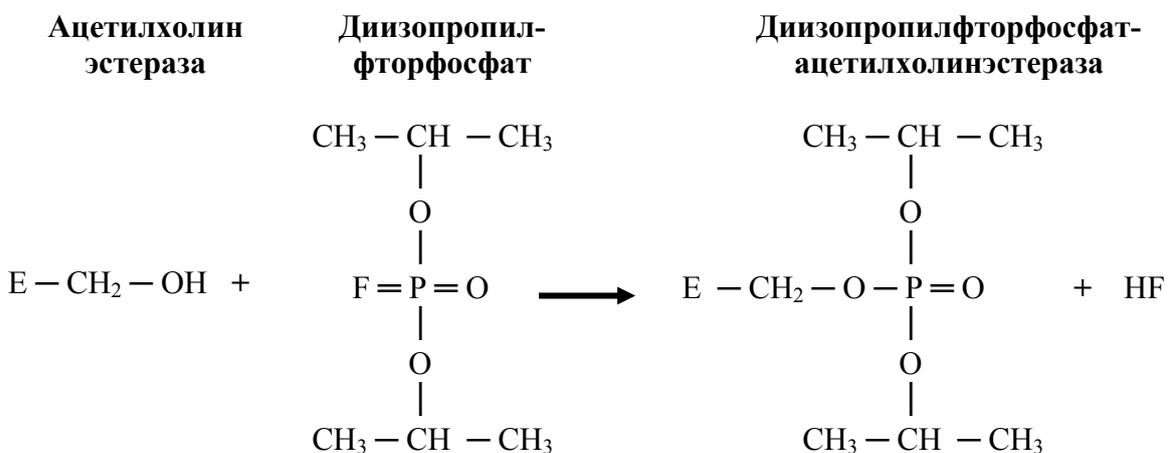


Освободившийся нейрон готов к передаче следующего импульса. Если ацетилхолинэстераза ингибирована, то ацетилхолин накапливается, нервные импульсы следуют один за другим и мышца длительное время не расслабляется. В конце концов, наступает паралич или смерть.

Однако ДФФ обладает и полезными свойствами. На его основе был

создан ряд относительно нетоксичных для людей и животных инсектицидов малатион. Сам по себе малатион неактивен и в организме высших животных разлагается на продукты, которые считаются безвредными. В организме же насекомых под действием ферментов он превращается в активный ингибитор их собственной ацетилхолинэстеразы.

Выяснилось, что ДФФ ингибирует целый класс ферментов, многие из которых способны катализировать гидролиз пептидов и эфирных связей. К этим ферментам относится не только ацетилхолинэстераза, но и трипсин, хитотрипсин, эластаза, фосфоглюкомутаза и коконаза (фермент, выделяемый личинкой тутового шелкопряда и используемый ею для гидролиза шелковых нитей и освобождения из кокона). Характерная особенность всех ферментов, ингибируемых ДФФ, состоит в том, что они содержат в активном центре остаток серина, принимающий участие в каталитическом акте:



Некоторые ферменты полностью ингибируются очень малыми концентрациями ионов тяжелых металлов, например ионов ртути (Hg^{2+}), серебра (Ag^+) и мышьяка (As^+) или йодуксусной кислотой. Эти вещества необратимо соединяются с сульфгидрильными группами (-SH) и вызывают осаждение ферментного белка.

В случае обратимого действия ингибитор образует с ферментом непрочный комплекс, способный распадаться, в результате чего снова возникает активный фермент. Обратимое действие ингибитора может быть описано уравнением



Обратимое ингибирование в свою очередь разделяют на *конкурентное* и *неконкурентное*, в зависимости от того, удастся или не удастся преодолеть торможение ферментативной реакции путем увеличения концентрации субстрата.

Конкурентное ингибирование может быть вызвано веществами, имеющими структуру, похожую на структуру субстрата, но несколько отличающуюся.

щуются от структуры истинного субстрата. Такое ингибирование основано на связывании ингибитора с субстратсвязывающим (активным) центром. Этот тип ингибирования иногда называют *ингибированием по типу метаболического антагонизма* (рис. 15.1).

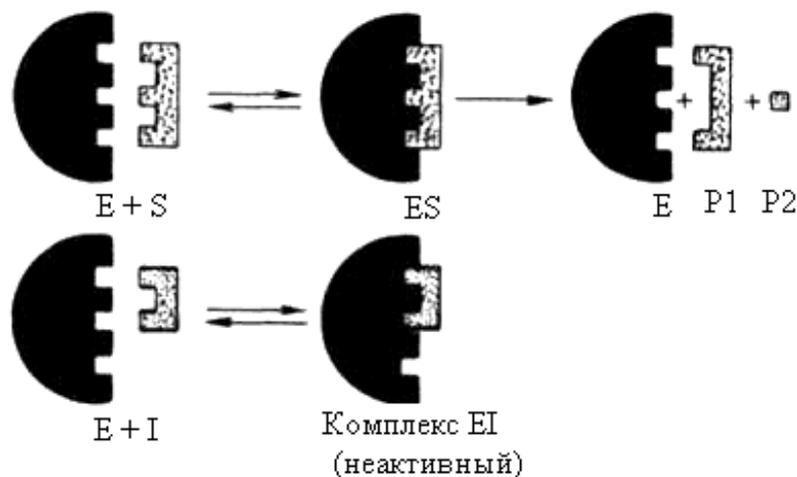


Рис. 15.1. Действие конкурентного ингибитора (схема по В.Л. Кретовичу): E – фермент; S – субстрат; P1 и P2 – продукты реакции; I – ингибитор

Классическим примером подобного типа ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малоновой кислотой (рис.15.2). На рис. 15.2, а видно, что фумаровая кислота покидает фермент, а освободившаяся молекула фермента снова готова к работе. На рис. 15.2, б показано, что малоновая кислота блокирует фермент СДГ и не позволяет ему связываться с обычным субстратом.

Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты (сукцината) в фумаровую. Если в среду добавить малонат (ингибитор), в результате его структурного сходства с истинным субстратом сукцинатом, проявляющейся в наличии двух таких же ионизированных карбоксильных групп, он будет взаимодействовать с активным центром с образованием фермент-ингибиторного комплекса, однако при этом полностью исключается перенос атома водорода от малоната. Структуры субстрата (сукцинат) и ингибитора (малонат) все же несколько различаются. Поэтому они конкурируют за связывание с активным центром и степень торможения определяется соотношением концентраций малоната и сукцината, а не абсолютной концентрацией ингибитора. Таким образом, ингибитор может обратимо связываться с ферментом, образуя фермент-ингибиторный комплекс.

а

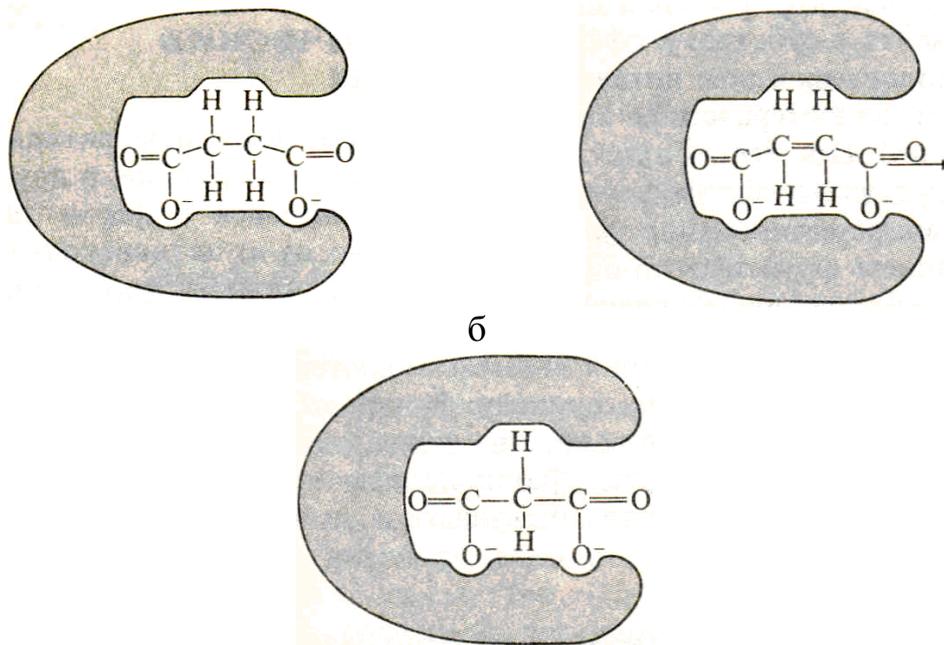
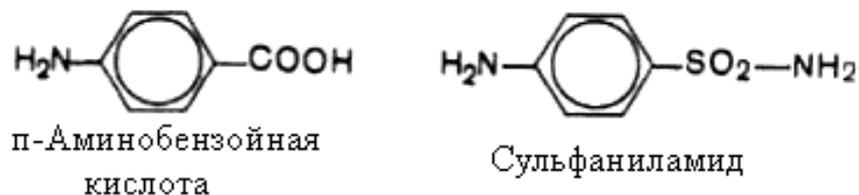


Рис. 15.2. Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой: а – реакция превращения янтарной кислоты в фумаровую под действием сукцинатдегидрогеназы; б – ингибирование малоновой кислотой реакции превращения янтарной кислоты в фумаровую

Метод конкурентного торможения нашел широкое применение в медицинской практике. Известно, например, что для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяют сульфаниламидные препараты. Оказалось, что эти препараты имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой, которую бактериальная клетка использует для синтеза фолиевой кислоты, являющейся составной частью ферментов бактерий. Благодаря этому структурному сходству сульфаниламид блокирует действие фермента путем вытеснения парааминобензойной кислоты из комплекса с ферментом, синтезирующим фолиевую кислоту, что ведет к торможению роста бактерий:



Неконкурентные ингибиторы по своей структуре не родственны субстрату данного фермента; в образовании комплекса с ингибитором в этом случае участвует не активный центр фермента, а какая-нибудь другая часть его молекулы. Образование комплекса влечет изменение глобулярной структуры фермента, и, хотя настоящий субстрат при этом к ферменту все же присоединяется, катализ, тем не менее, невозможен ([рис. 15.3](#)).

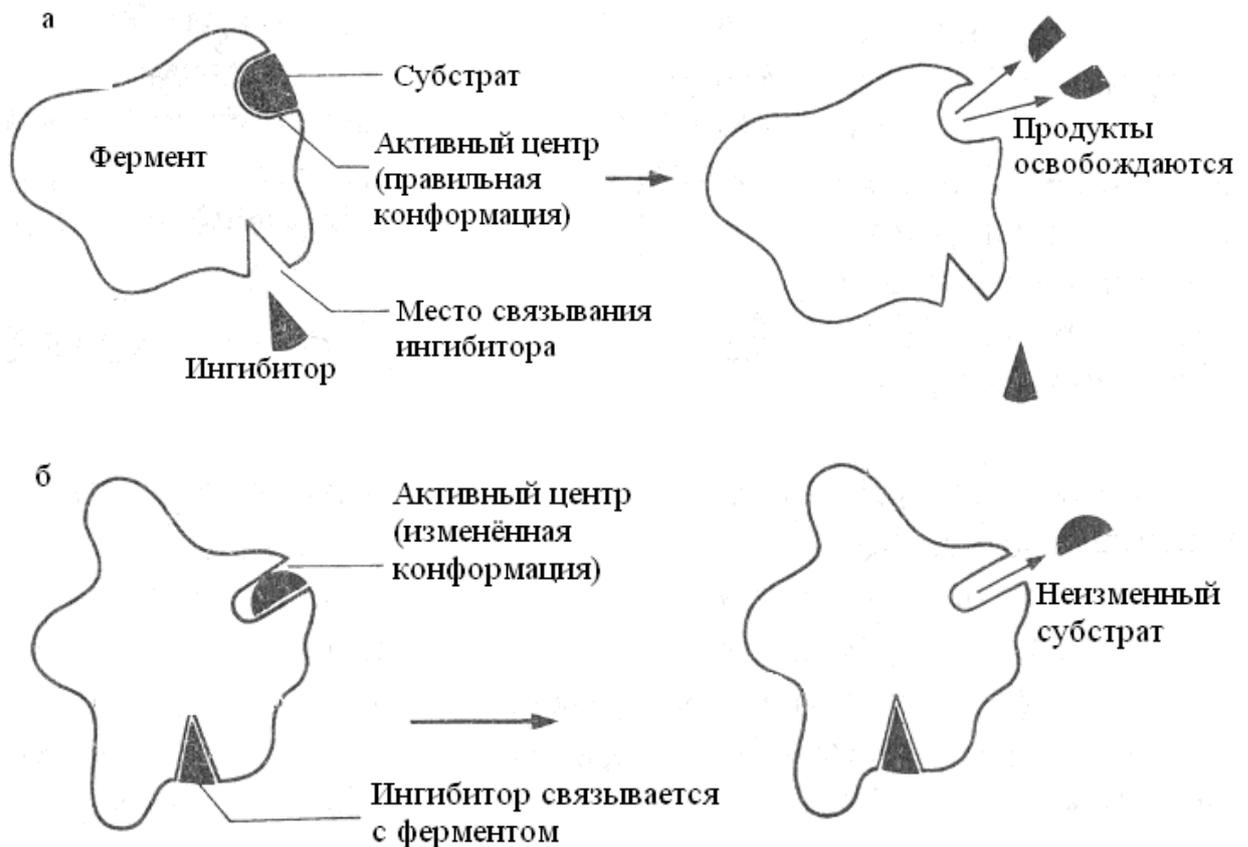


Рис. 15.3. Неконкурентное ингибирование: а – нормальная реакция; б – неконкурентное ингибирование

На [рис. 15.3, а](#) показано, что субстрат правильно связывается с ферментом, а ингибитор с ферментом не связывается. Активный центр фермента и сам фермент имеют нормальную конформацию. После протекания реакции освобождаются продукты реакции. На [рис. 15.3, б](#) видно, что фермент образует комплекс с ингибитором, в результате происходит изменение конформации фермента и он утрачивает способность функционировать. Настоящий субстрат выходит из реакции в неизменном виде.

В качестве примера неконкурентного ингибитора можно привести цианид. Он связывается с ионами металлов, выполняющими у некоторых ферментов роль простетической группы (в частности, с ионами меди цитохромоксидазы), и подавляет активность этих ферментов. С повышением концентрации ингибитора скорость ферментативной реакции снижается. К моменту насыщения ингибитором она оказывается практически равной нулю.

Для выяснения вопроса о типе ингибирования пользуются уравнениями Михаэлиса – Ментен, Лайнуивера – Бэрка или другими и соответствующими графиками в прямолинейных координатах. При конкурентном типе ингибирования ингибитор увеличивает значение K_m , не оказывая влияния на максимальную скорость V_{max} ([рис. 15.4, а, б](#)). Это означает, что при достаточно высокой концентрации субстрата $[S]$ ингибитор вытесняется молекулами субстрата из комплекса EI .

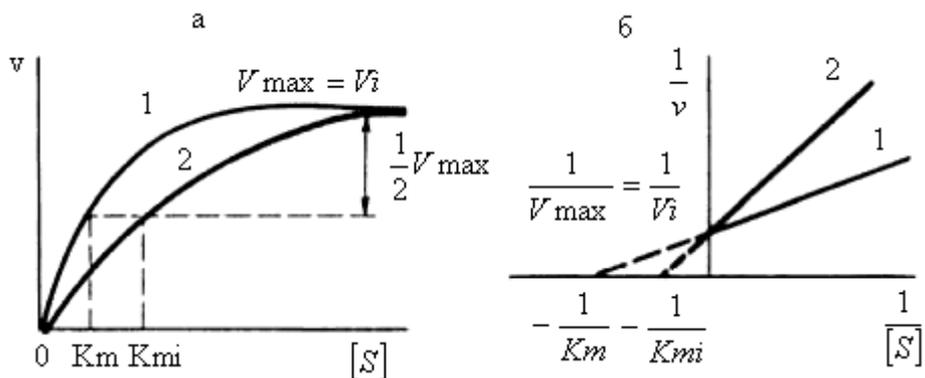


Рис. 15.4. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора: а- в координатах v от $[S]$; б- в координатах $1/v$ от $1/[S]$; V_{max} и V_i - максимальные скорости реакции; K_m и K_{mi} - константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора

При неконкурентном ингибировании (рис.15.5, а, б) ингибитор снижает величину максимальной скорости.

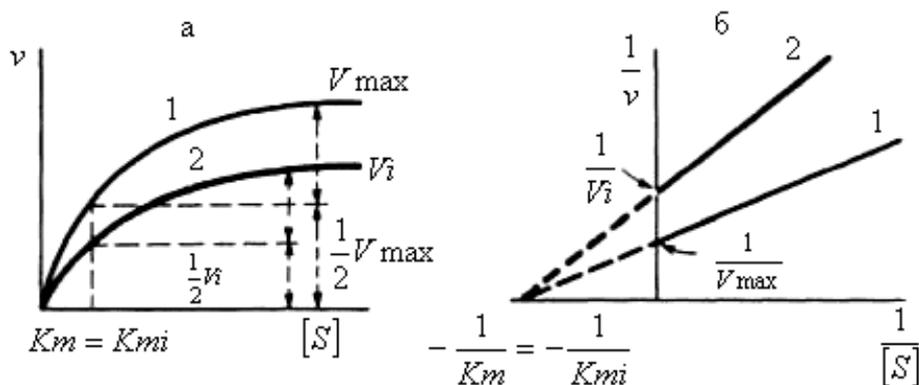


Рис. 15.5. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора: а – в координатах v от $[S]$; б – в координатах $1/v$ от $1/[S]$; V_{max} и V_i – максимальные скорости реакции; K_m и K_{mi} – константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора

Если при этом величина K_m не уменьшается, говорят о полностью неконкурентном ингибировании. Подобный тип ингибирования имеет место при образовании неактивных, труднодиссоциирующих комплексов EI и (или) EIS. Таким образом, при графическом анализе скоростей ферментативных реакций как функции концентраций субстрата может быть получена ценная информация не только о кинетике ферментативных реакций, но и о молекулярных механизмах ферментативного катализа.

Регуляция каталитической активности ферментов

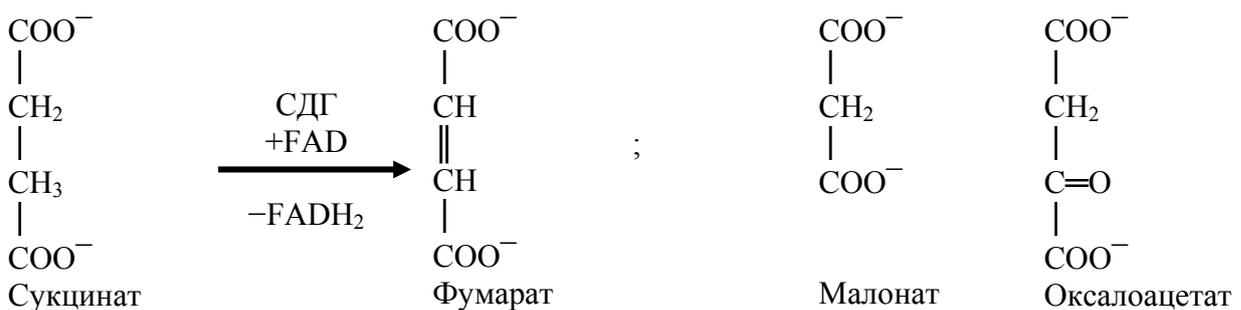
Способность к сохранению сбалансированности катаболических и анаболических процессов является одним из уникальных свойств живых

организмов. При этом в клетках одновременно совершаются процессы синтеза, распада и взаимопревращения сотен и тысяч разнообразных веществ, которые в свою очередь регулируются множеством механизмов, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма. Важная роль среды при этом принадлежит регуляции каталитической активности ферментов.

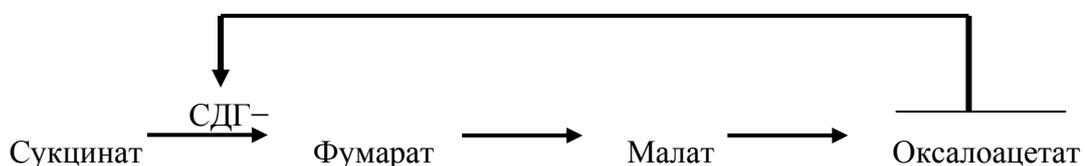
Изостерическая регуляция

Если метаболит или ксенобиотик имеет структурное сходство с субстратом, то он может связываться с субстратным активным центром фермента, подавляя его каталитическую активность. Такие ингибиторы называют *квасисубстратами*. Сродство субстрата к ферменту больше, чем сродство квазисубстрата, и в присутствии субстрата и квазисубстрата между ними наблюдается конкуренция за активный центр фермента. Ингибирующее действие зависит от соотношения «субстрат – квазисубстрат».

Классическим примером изостерического ингибирования является действие малоната на активность сукцинатдегидрогеназы см. [рис. 15.2](#). Для 50%-го угнетения СДГ соотношение сукцинат/малонат должно составлять 1:50:



Изостерическим ингибитором СДГ является также оксалоацетат, который регулирует, таким образом, заключительные этапы цикла Кребса по типу обратной связи:



Изостерические ингибиторы известны и для ферментов, метаболизирующих витамины или присоединяющих коферменты. Для каждого витамина описаны десятки его структурных аналогов, обладающих свойствами изостерических ингибиторов витаминзависимых ферментов. Многие из этих аналогов используются в качестве антибактериальных, антипротозойных лекарственных препаратов (сульфаниламиды, противомаларийные препараты и др.). Сульфаниламидные препараты применяются для борьбы с инфекцион-

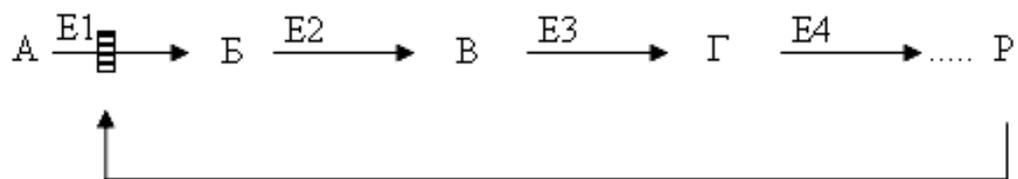
ными заболеваниями. По своей химической структуре близки к парааминобензойной кислоте (ПАБК) – необходимому фактору роста многих патогенных бактерий. ПАБК нужна бактериям для синтеза фолиевой кислоты, которая служит у них кофактором фермента. Действие сульфаниламидов связано с нарушением синтеза фолиевой кислоты из ПАБК. Животные клетки нечувствительны к сульфаниламидам, хотя для некоторых реакций им требуется фолиевая кислота. Объясняется это тем, что они используют преобразованную фолиевую кислоту; метаболический путь, который обеспечивал бы ее синтез, у животных отсутствует.

Изостерические аналоги витаминов часто называют *антагонистами витаминов* из-за их способности вызывать соответствующие авитаминозы. Особенно многочисленны антагонисты рибофлавина, из числа которых наиболее активны изорибофлавин, люмифлавин, галактофлавин и др.

Аллостерический контроль активности ферментов

При многих строго биосинтетических реакциях основным типом регуляции скорости многоступенчатого ферментативного процесса является *ингибирование по принципу обратной связи (ретроингибирование)*. Это означает, что конечный продукт биосинтетической цепи подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию синтеза, которая является ключевой для данной цепи реакции. Поскольку конечный продукт структурно отличается от субстрата, он связывается с аллостерическим (некаталитическим) центром молекулы фермента, вызывая ингибирование всей цепи синтетической реакции.

Предположим, что в клетках осуществляется многоступенчатый биосинтетический процесс, каждая стадия которого катализируется собственным ферментом:



Скорость подобной суммарной последовательности реакций в значительной степени определяется концентрацией конечного продукта Р, при сверхдопустимом уровне которого отмечается мощное ингибирующее действие на первую стадию процесса и соответственно на фермент Е1.

Существование такого типа ингибирования доказано во всех живых организмах. В настоящее время он рассматривается как один из ведущих типов регуляции активности ферментов и клеточного метаболизма в целом.

С другой стороны, в амфиболических процессах, выполняющих одновременно биосинтетические и биodeградативные функции, доказано существование регуляции как по типу ретроингибирования, так и макроэргическими соединениями – индикаторами энергетического состояния клетки.

Для амфиболических процессов уникальным типом регуляции, свойственным только им, является, кроме того, активация предшественником, когда первый метаболит в многоступенчатом пути активирует фермент, катализирующий последнюю стадию. Так, доказано активирующее влияние глюкозо-6-фосфата, являющегося предшественником гликогена, на фермент гликогенсинтазу.

Подобные типы ингибирования конечным продуктом и активирования первым продуктом свойственны аллостерическим (регуляторным) ферментам, когда эффектор, модулятор, структурно отличаясь от субстрата, связывается в особом (аллостерическом) центре молекулы фермента, пространственно удаленном от активного центра. Следует, однако, иметь в виду, что модуляторами аллостерических ферментов могут быть как активаторы, так и ингибиторы. Часто оказывается, что сам субстрат оказывает активирующий эффект. Ферменты, для которых и субстрат, и модулятор представлены идентичными структурами, носят название *гомотропных* в отличие от *гетеротропных* ферментов, для которых модулятор имеет отличную от субстрата структуру.

Взаимопревращение активного и неактивного аллостерических ферментов в упрощенной форме, а также конформационные изменения, наблюдаемые при присоединении субстрата и эффекторов, представлены на [рис. 15.6](#). Присоединение отрицательного эффектора к аллостерическому центру вызывает значительные изменения конфигурации активного центра молекулы фермента, в результате чего фермент теряет сродство к своему субстрату (образование неактивного комплекса).

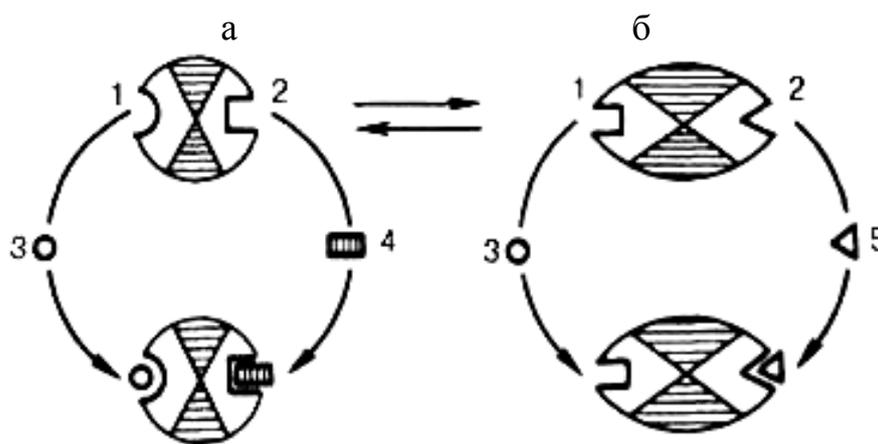


Рис.15.6. Взаимодействие аллостерического фермента с субстратом и эффекторами: а – активный комплекс; б – неактивный комплекс; 1 – активный центр; 2 – аллостерический центр; 3 – субстрат; 4 – положительный эффектор; 5 – отрицательный эффектор

Аллостерические взаимодействия проявляются в характере кривых зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата или эффектора, в частности в S-образности этих кривых (отклонение от гиперболической кривой Михаэлиса-Ментен). S-образный характер зависимости v от

[S] в присутствии модулятора обусловлен эффектом кооперативности. Это означает то, что связывание одной молекулы субстрата облегчает связывание второй в активном центре, тем самым способствуя увеличению скорости реакции. Кроме того, для аллостерических регуляторных ферментов характерна нелинейная зависимость скорости реакции от концентрации субстрата.

Регуляция ферментов ковалентной модификацией

Некоторые белки при формировании третичной структуры подвергаются постсинтетической химической модификации. Оказалось, что активность ряда ключевых ферментов обмена углеводов, в частности фосфоорилазы, гликогенсинтетазы и др. также контролируется путём фосфорилирования и дефосфорилирования, осуществляемого специфическими ферментами – протеинкиназой и протеинфосфатазой, активность которых в свою очередь регулируется гормонами. Уровень активности ключевых ферментов обмена углеводов и соответственно интенсивность и направленность самих процессов обмена определяются соотношением фосфорилированных и дефосфорилированных форм этих ферментов.

Присоединение фосфорной кислоты осуществляется через OH-группы серина, треонина, реже – тирозина. Активным ферментом оказывается или фосфорилированная, или дефосфорилированная форма, как в случае с молекулами мышечной фосфоорилазы и гликогенсинтетазы соответственно.

На [рис. 15.7](#) приведена схема ковалентной модификации по типу фосфорилирование – дефосфорилирование, где символом P обозначается остаток фосфата, P_i– неорганический фосфат (H₃PO₄).

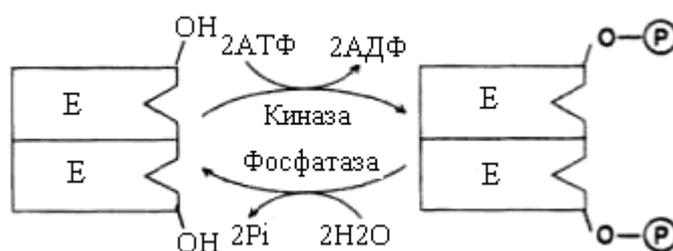


Рис. 15.7. Ковалентная модификация фермента фосфорилированием – дефосфорилированием остатков серина

Химическая постсинтетическая модификация ферментов включает, кроме того, процессы ограниченного протеолиза, метилирования, гликозилирования, уридилирования, аденилирования, ADP-рибозилирования и др., обеспечивая тем самым микроскопический тип регуляции активности ферментов и соответственно физиологическую скорость процессов обмена веществ.

Регуляция ферментов ограниченным протеолизом (активация зимогенов)

Протеолитические ферменты пищеварительного тракта, а также поджелудочной железы синтезируются в неактивной форме – в виде проферментов (зимогенов). Регуляция в этих случаях сводится к превращению проферментов в активные ферменты под влиянием специфических агентов или других ферментов – протеиназ. Так, трипсин в поджелудочной железе синтезируется в форме неактивного трипсиногена. Поступив в кишечник, он превращается в активный трипсин в результате аутокатализа или под действием других протеиназ. Превращение неактивного пепсиногена в активный пепсин происходит аутокаталитически в результате специфического *ограниченного протеолиза* в присутствии соляной кислоты и также связано с отщеплением от профермента специфического ингибитора пептидной природы. Эти превращения *зимогенов* в активные ферменты связаны с конформационными изменениями молекулы фермента и формированием активного центра или его раскрытием (демаскирование). Синтез протеиназ в неактивной форме и ряда других неактивных белков-предшественников имеет, очевидно, определенный биологический смысл, предотвращая разрушение клеток органов, в которых образуются проферменты. Примерами подобного активирования белков является активирование некоторых гормонов (проинсулин → инсулин), белка соединительной ткани (растворимый проколлаген → в нерастворимый коллаген), белков свертывающей системы крови.

Регуляция активности мультиэнзимных комплексов

Когда мы имеем дело с многоэтапным биохимическим процессом, в котором принимают участие ряд растворимых ферментов, их действие строго координировано: действие одного фермента – необходимый этап для действия другого. Подобная неразрывная связь отдельных ферментативных реакций имеет место, например, при спиртовом брожении, которое идет под влиянием растворимого комплекса ферментов зимазы. В этом случае мы имеем дело с многоферментной системой, включающей ряд ферментов, катализирующих отдельные реакции. В такой растворимой ферментной системе отдельные ферменты действуют в линейной последовательности таким образом, что продукт, возникающий в результате действия одного фермента, становится субстратом для следующего фермента и т. д. В подобной системе взаимодействие между отдельными ферментами осуществляется благодаря сравнительно небольшим молекулам субстратов, быстро диффундирующим от одного фермента к другому ([рис. 15.8](#)).

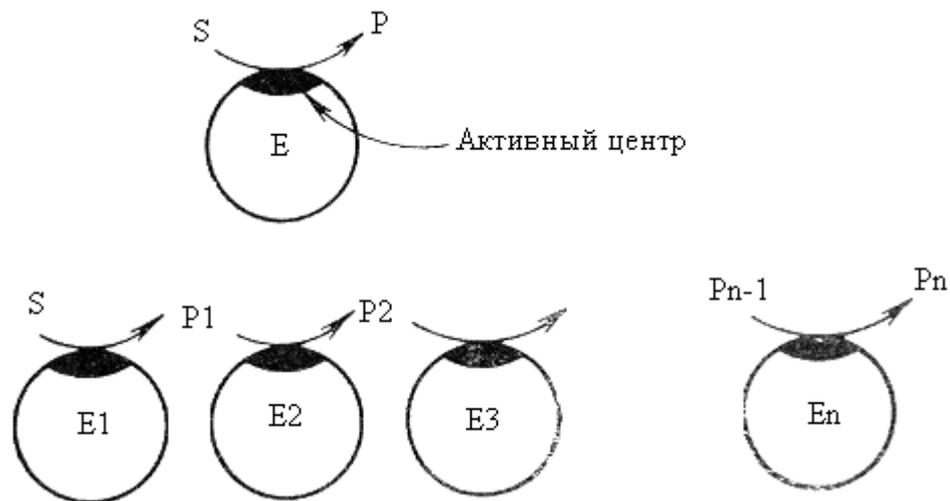


Рис. 15.8. Взаимодействие отдельных ферментов в «растворимой» ферментной системе: E1 ... En – ферменты; S – субстрат; P1 ... Pn – продукты реакций

В «растворимой» ферментной системе скорость всего процесса в значительной степени определяется концентрацией каждого отдельного промежуточного продукта, являющегося субстратом для следующего фермента. Поэтому всякое воздействие, которое вызывает повышение или понижение концентрации того или иного промежуточного субстрата или продукта, может привести к изменению скорости процесса в целом.

Классификация и номенклатура ферментов

Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве. Комиссия по ферментам рекомендовала использование *двух номенклатур*:

1) *Систематическое (рациональное) название фермента* составляется в соответствии с определёнными правилами, по возможности точно указывает действие фермента и тем самым точно его идентифицирует.

2) *Рабочее (тривиальное, рекомендуемое) название фермента* используется в повседневной практике, оно должно быть достаточно кратким, но не обязательно систематичным. Во многих случаях это исторически сложившиеся наименования (например, амилаза, пепсин и др.).

Согласно Международной *классификации*, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых несколько подклассов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы), см. [табл. 15.1](#). В основу принятой классификации положен тип катализируемой реакции, который является специфичным для действия любого фермента. Этот принцип логично использовать в качестве основы для классификации и номенклатуры ферментов.

Международная классификация ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1.	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2.	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3.	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)
4.	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5.	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6.	Лигазы (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей С-С, С-О, С-S и С-N, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

В 1972 г. Комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии были предложены Правила номенклатуры ферментов. Коды ферментов по этим правилам имеют *четырёхзначное цифровое обозначение*, в которых первая цифра обозначает *класс* фермента, вторая – (*подкласс*), т.е. уточняет преобразуемую группировку, третья – *подподкласс*, т.е. уточняет дополнительных участников реакции (например, донора и акцептора), четвёртая – показывает порядковый номер фермента в данной подгруппе. Так, фермент малатдегидрогеназа имеет систематическое название L-малат: NAD⁺ оксидоредуктаза и кодовый шифр 1.1.1.38.

Характеристика отдельных классов ферментов

Оксидоредуктазы. К классу оксидоредуктаз относят ферменты, с участием двух субстратов катализирующие окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза». Например, лактат: NAD⁺ оксидоредуктаза для лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Различают следующие основные оксидоредуктазы: аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород; анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород; цитохромы, катализирующие перенос только электронов. К этому классу относят также гемсодержащие ферменты каталазу и пероксидазу, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

Трансферазы. К классу трансфераз относят ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и

радикалов. Наименование их составляется по форме «донор: транспортируемая группа-трансфераза».

Различают трансферазы, катализирующие перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Например: метил- и формилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

Гидролазы. В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их составляют по форме «субстрат-гидролаза». К ним относятся: эстеразы – ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров; гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей; фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей; амидазы, ускоряющие разрыв амидных связей, отличных от пептидных, и др.

Лиазы. К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей С-О, С-С, С-N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов негидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту разрыва двойной связи. Ферменты обозначают термином «субстрат-лиазы». Например, фумарат-гидратаза (систематическое название «L-малат-гидролаза») катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбокси-лиазы), амидин-лиазы и др.

Изомеразы. К классу изомераз относят ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических и геометрических изомеров. Систематическое название их составляют с учетом типа реакции: «субстрат- *цис-транс*-изомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название «мутаза».

К этому же классу относят рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты, углеводы и их производные, внутримолекулярные оксидоредуктазы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз; внутримолекулярные трансферазы, переносящие ацильные, фосфорильные и другие группы, и т. д.

Лигазы (синтетазы). К классу лигаз (синтетаз) относят ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ (или другого нуклеозидтрифосфата). Систематическое название их составляют по форме «X : Y лигаза», где X и Y – исходные вещества. В качестве примера можно назвать L-глутамат: аммиак лигазу (рекомендуемое сокращенное название «глутаминсинтетаза»), при участии которой из глутаминовой кислоты и аммиака в присутствии АТФ синтезируется глутамин. В случае, когда источником энергии служит любое другое макроэргическое соединение (не АТФ), ферменты называют синтазами.

Ферменты в клинической диагностике. Энзимопатии

Достижения энзимологии находят все большее применение в медицине, в частности в профилактике, диагностике и лечении болезней. Успешно развивается новое направление энзимологии – медицинская энзимология. Выделяются три её главных направления: 1) изучение *энзимопатологий* (энзимопатий), то есть таких болезней, причина которых лежит в недостаточности или полном отсутствии какого-либо фермента; 2) *энзимодиагностика*, то есть использование ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения нормальных или аномальных химических веществ в биологических жидкостях или открытие и количественное определение самих ферментов в биологических жидкостях при патологиях; 3) *энзимотерапия*, т.е. использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов) действия ферментов в качестве лекарственных средств.

МОДУЛЬ II. ДИНАМИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Лекция 16

Обмен веществ и энергии в живых системах. Расщепление углеводов в пищеварительном тракте

Понятие метаболизма.

Центральные и специальные метаболические пути

В живых клетках протекает множество ферментативных реакций. Всю совокупность этих реакций объединяют общим понятием «*метаболизм*» («*обмен веществ*»). Он выполняет четыре специфические функции: 1) снабжение химической энергией, которая добывается путем расщепления богатых энергией пищевых веществ, поступающих из среды, или путем преобразования улавливаемой энергии солнечного света; 2) превращение молекул пищевых веществ в строительные блоки, которые в дальнейшем используются клеткой для построения макромолекул; 3) сборка белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов и прочих клеточных компонентов из этих строительных блоков; 4) синтез и разрушение тех биомолекул, которые необходимы для выполнения каких-либо специфических функций.

Выделяют внешний и промежуточный обмен веществ:

Внешний обмен веществ – внеклеточное переваривание веществ на путях их поступления и выделения из организма.

Промежуточный обмен веществ □ превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

Попав внутрь клетки, питательное вещество метаболизируется, т.е. претерпевает ряд химических изменений, катализируемых ферментами. Определённая последовательность таких химических изменений называется *метаболическим путём*, а образующиеся промежуточные продукты – *метаболитами*.

Большой частью метаболические пути *линейны* (рис. 16.1). На рисунке показано, что в результате четырех последовательных ферментативных реакций предшественник А превращается в продукт Е, а продукт одной ферментативной реакции служит субстратом следующей:

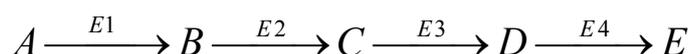


Рис. 16.1. Линейный метаболический путь

Кроме линейных выделяют *циклические метаболические пути* (рис. 16.2). Обычно они имеют разветвления, в которых какие-нибудь продукты реакций выходят из цепи реакций данного метаболического пути или, наоборот, вливаются в нее:

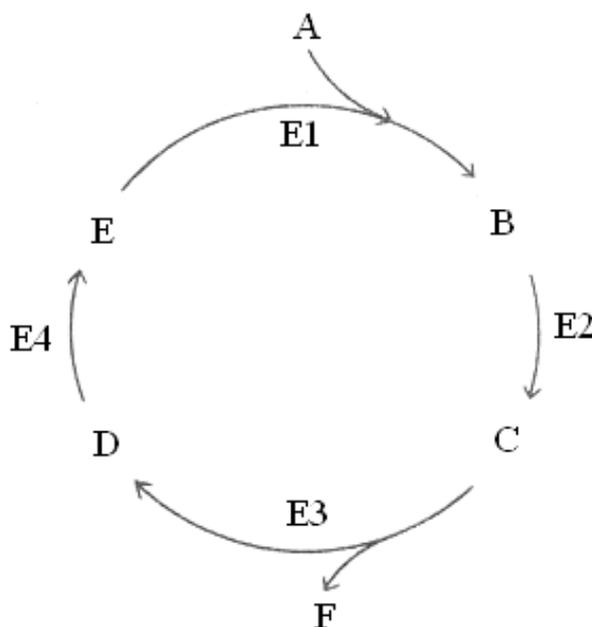


Рис. 16.2. Циклический путь

Именно таким путем происходит окисление ацетильных групп до CO_2 и H_2O в цикле лимонной кислоты

Все метаболические пути делят на центральные и специальные (вторичные). *Центральные метаболические пути* – пути превращения основных пищевых веществ в клетке (углеводов, жиров, белков и нуклеиновых кислот). На этих путях потоки метаболитов довольно внушительны. Например, в организме взрослого человека ежедневно окисляется несколько сотен граммов глюкозы до CO_2 и воды. Последовательности химических превращений на каждом из центральных метаболических путей, в принципе, у всех живых форм едины. Так, например, расщепление D-глюкозы протекает почти у всех живых организмов одинаково, т. е. через те же реакции и с образованием одних и тех же промежуточных продуктов.

Кроме центральных путей есть и другие метаболические пути со значительно меньшим потоком метаболитов (ежесуточный синтез или распад при этом измеряется миллиграммами). Эти *специальные метаболические пути* составляют так называемый вторичный метаболизм, роль которого – в образовании различных специализированных веществ, требующихся клеткам в малых количествах. К вторичным метаболическим путям принадлежит, например, биосинтез коферментов и гормонов, потому что эти соединения вырабатываются и используются только в следовых количествах. Сотни различных высокоспециализированных биомолекул, в том числе нуклеотиды, пигменты, токсины, антибиотики и алкалоиды, продуцируются у разных форм жизни на вторичных метаболических путях.

Катаболические, анаболические, амфиболические пути

Промежуточный метаболизм складывается из двух фаз: катаболизма и анаболизма. *Катаболизм* – это фаза, на которой происходит расщепление сложных органических молекул до более простых конечных продуктов. Углеводы, жиры и белки, поступившие извне с пищей или присутствующие в самой клетке в качестве запасных веществ, распадаются в серии последовательных реакций до таких соединений, как молочная кислота, CO₂ и аммиак. Катаболические процессы сопровождаются высвобождением свободной энергии, заключенной в сложной структуре больших органических молекул. На определенных этапах соответствующих катаболических путей значительная часть свободной энергии запасается в форме высокоэнергетического соединения – АТФ (благодаря сопряженным ферментативным реакциям). Часть ее запасается также в богатых энергией водородных атомах кофермента NADH (NADPH), находящегося в восстановленной форме ([рис. 16.3](#)).



Рис. 16.3. Энергетические взаимосвязи между катаболическим и анаболическим путями

На [рис. 16.3](#) видно, что катаболические пути поставляют химическую энергию в форме АТФ и NADPH. Эта энергия используется на анаболических путях для биосинтеза макромолекул из небольших молекул – предшественников.

Ферментативное расщепление тех главных питательных веществ, которые служат клетке источником энергии, а именно углеводов, жиров и белков,

совершается постепенно, т.е. через ряд последовательных ферментативных реакций. В аэробном катаболизме различают три главные стадии (рис. 16.4). На первой стадии макромолекулы клетки распадаются на свои основные «строительные блоки»: полисахариды → до гексоз или пентоз, жиры → до жирных кислот, глицерола и других компонентов, белки – до аминокислот.

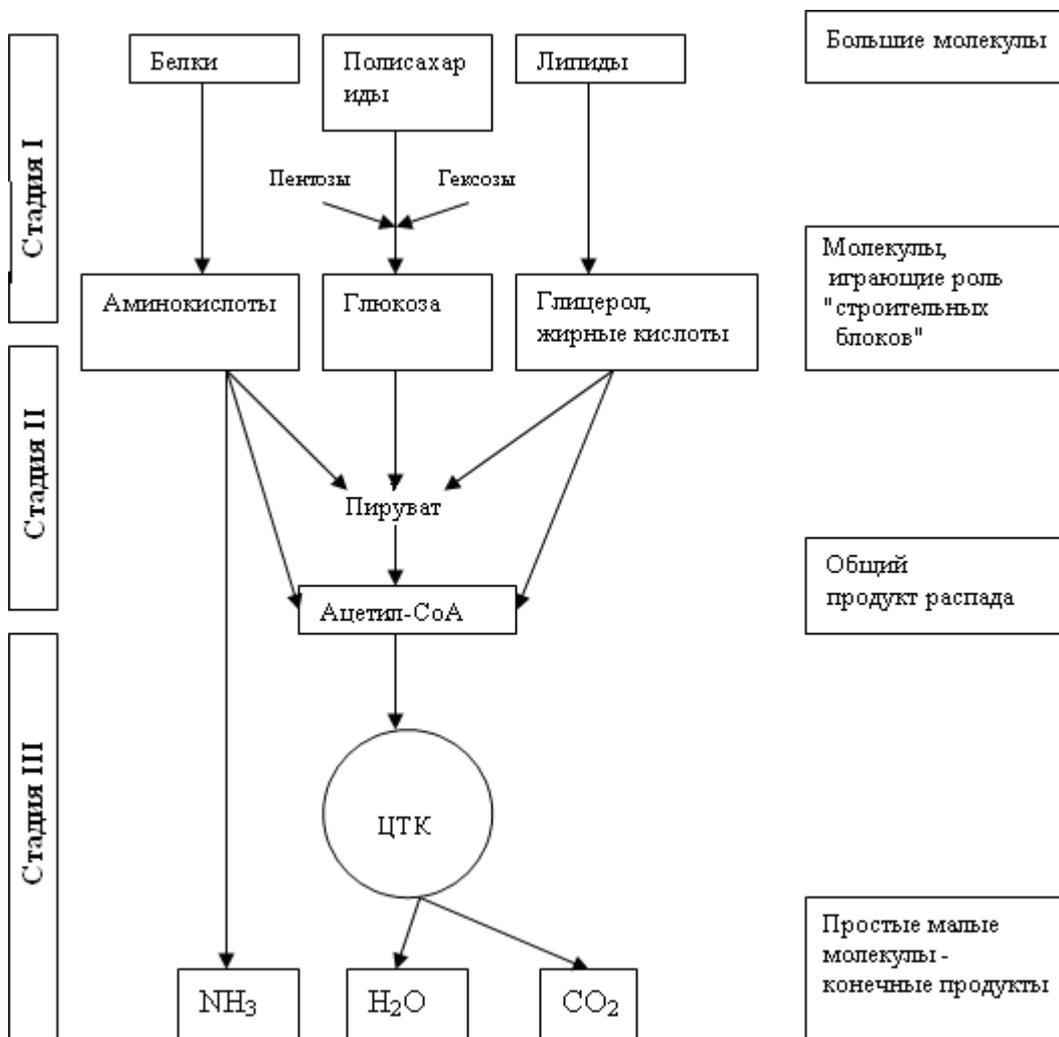


Рис. 16.4. Три стадии катаболических превращений основных питательных веществ в клетке

На второй стадии эти «строительные блоки» превращаются в один общий продукт → ацетильную группу ацетил-СоА. На третьей стадии различные катаболические пути сливаются в один общий путь – цикл лимонной кислоты; в результате всех этих превращений образуются только три конечных продукта. Расщепление нуклеиновых кислот происходит также поэтапно, но на рис.16.4 этот процесс не показан, поскольку его вклад сравнительно невелик.

Все продукты, образовавшиеся на первой стадии катаболизма, на второй стадии превращаются в еще более простые соединения, число которых сравнительно невелико. Гексозы, пентозы и глицерол расщепляются до одного и того же трехуглеродного промежуточного продукта (пирувата), а затем –

до единственной двухуглеродной формы ацетильной группы ацетилкофермента А (ацетил-СоА). Аналогичное превращение претерпевают жирные кислоты и углеродные скелеты большей части аминокислот: их расщепление также завершается образованием ацетильных групп в форме ацетил-СоА. Таким образом, ацетил-СоА представляет собой общий конечный продукт второй стадии катаболизма.

На третьей стадии ацетильная группа ацетил-СоА вступает в цикл лимонной кислоты – общий конечный путь, на котором почти все виды клеточного «топлива» в конце концов, окисляются до двуокиси углерода. Конечными продуктами метаболизма являются также вода и аммиак (или другие азотсодержащие соединения).

Важно отметить, что *катаболические пути* сходятся, вливаясь на третьей стадии в общий путь – цикл лимонной кислоты. Если на первой стадии десятки и даже сотни различных белков расщепляются до аминокислот, которых насчитывается 20 видов, то уже на второй стадии из всех двадцати аминокислот образуются в основном только ацетил-СоА и аммиак, а на третьей стадии ацетильные группы ацетил-СоА, окисляясь в цикле лимонной кислоты, превращаются только в два продукта – CO_2 и H_2O . Точно так же многие полисахариды и дисахариды расщепляются на первой стадии до нескольких простых сахаров, которые на второй стадии превращаются в конечном счете в ацетил-СоА, а на третьей стадии – в CO_2 и H_2O .

Анаболизм, называемый также *биосинтезом*, – та фаза метаболизма, в которой из малых молекул-предшественников, или «строительных блоков», синтезируются белки, нуклеиновые кислоты и другие макромолекулярные компоненты клеток. Поскольку биосинтез – процесс, в результате которого увеличиваются размеры молекул и усложняется их структура, он требует затраты свободной энергии. Источником энергии служит распад АТФ до АДФ и неорганического фосфата. Для биосинтеза некоторых клеточных компонентов требуются также богатые энергией водородные атомы, донором которых является NADPH (см. [рис. 16.3](#)).

Анаболизм, или биосинтез, начинающийся с малых молекул-предшественников, протекает также в три стадии. Синтез белков, например, начинается с образования α -кетокислот и других предшественников. На второй стадии происходит аминирование α -кетокислот в реакциях с донорами аминогрупп. Образуются α -аминокислоты. На последней, завершающей, стадии анаболизма из аминокислот строятся полипептидные цепи и образуются различные белки. Сходным образом синтезируются липиды. Их синтез начинается с включения ацетильных групп в жирные кислоты и завершается сборкой различных липидных молекул из этих жирных кислот. В отличие от катаболизма для анаболизма характерно *расхождение* метаболических путей. Из сравнительно небольшого числа простых молекул-предшественников образуется в конечном счете весьма широкий набор разнообразных макромолекул. На центральных путях анаболизма имеется много ответвлений, что и дает в результате сотни различных клеточных компонентов.

Катаболический путь и соответствующий ему, но противоположный по направлению анаболический путь между данным предшественником и данным продуктом обычно не совпадают. Могут различаться и промежуточные продукты, и отдельные стадии этих путей. Однако хотя соответствующие катаболические и анаболические пути неидентичны, их связывает общая стадия (стадия III, см. [рис. 16.4](#)), которая включает цикл лимонной кислоты и некоторые вспомогательные ферментативные реакции. Эту общую стадию называют иногда *амфиболической* стадией метаболизма (от греч. «amfi»-оба), поскольку она выполняет *двойную* функцию. В катаболизме на этой стадии завершается распад сравнительно небольших молекул, образовавшихся на второй стадии, а в анаболизме ее роль заключается в поставке небольших молекул-предшественников для биосинтеза аминокислот, жирных кислот и углеводов.

Катаболические и анаболические реакции протекают одновременно, однако их скорости регулируются независимо, они часто локализованы в разных участках клетки. Регуляция метаболизма осуществляется тремя способами: 1) при помощи аллостерических ферментов, 2) при помощи гормонов; 3) путем регулирования синтеза ферментов.

Метаболизм углеводов

Метаболизм (обмен) углеводов в организме человека состоит в основном из следующих процессов:

1. Расщепление в пищеварительном тракте поступающих полисахаридов и дисахаридов до моносахаридов. Всасывание моносахаридов из кишечника в кровь;

2. Синтез и распад гликогена в тканях, прежде всего в печени;

3. Гликолиз, т.е. расщепление глюкозы. Первоначально термином «гликолиз» обозначали только анаэробное брожение, завершающееся образованием молочной кислоты (лактата) или этанола и CO_2 . В настоящее время понятие «гликолиз» используется более широко для описания распада глюкозы, проходящего через образование глюкозо-6-фосфата, фруктозобисфосфата и пирувата как в отсутствие, так и в присутствии кислорода. В последнем случае употребляют термин «аэробный гликолиз» в отличие от «анаэробного гликолиза», завершающегося образованием молочной кислоты (лактата).

4. Аэробный путь прямого окисления глюкозы или, как его называют, пентозофосфатный путь (пентозный цикл).

5. Взаимопревращение гексоз.

6. Аэробный метаболизм пирувата. Этот процесс выходит за рамки углеводного обмена, однако может рассматриваться как его завершающая стадия: окисление продукта гликолиза – пирувата.

7. Наконец, важным является процесс глюконеогенеза, или образование углеводов из неуглеводных продуктов. Такими продуктами являются в первую очередь пировиноградная и молочная кислоты, глицерин, аминокислоты

и ряд других соединений.

Расщепление углеводов в пищеварительном тракте

Эпителиальные клетки кишечника способны всасывать только моносахариды. Поэтому процесс переваривания заключается в ферментативном гидролизе гликозидных связей в углеводах, имеющих олиго- или полисахаридное строение (рис. 16.5).

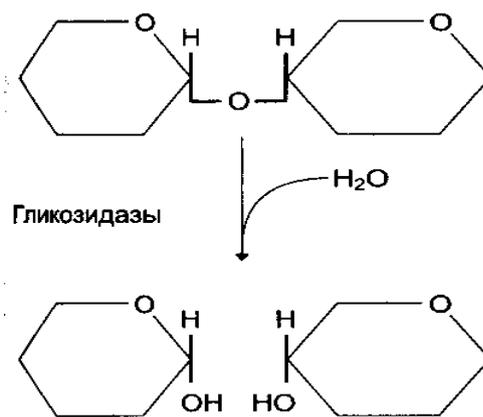


Рис. 16.5. Гидролиз гликозидной связи

Переваривание углеводов в ротовой полости

В ротовой полости пища измельчается при пережёвывании, смачиваясь при этом слюной. Слюна на 99% состоит из воды и обычно имеет значение рН, равное 6,8. В слюне присутствует гидролитический фермент α -амилаза (α -1,4-гликозидаза), расщепляющая в крахмале α -1,4-гликозидные связи. В ротовой полости крахмал не расщепляется полностью, т. к. действие фермента на него кратковременно. Кроме того, амилаза слюны не расщепляет α -1,6-гликозидные связи (связи в местах разветвлений); поэтому крахмал переваривается лишь частично с образованием крупных фрагментов (декстринов) и небольшого количества мальтозы. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

Действие амилазы слюны прекращается в резко кислой среде содержимого желудка (рН 1,5 – 2,5). Однако внутри пищевого комка активность амилазы может некоторое время сохраняться, пока уровень рН не изменится в кислую сторону. Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих углеводы. В желудочном содержимом возможен лишь незначительный кислотный гидролиз гликозидных связей.

Переваривание углеводов в кишечнике

Последующие этапы переваривания нерасщеплённого или частично расщеплённого крахмала, а также других углеводов пищи происходит в тон-

ком кишечника, в разных его отделах, под действием гидролитических ферментов □ гликозидаз.

Амилолитические ферменты: характеристика.
Панкреатическая α-амилаза

В двенадцатиперстной кишке рН среды желудочного содержимого нейтрализуется, т. к. секрет поджелудочной железы имеет рН – 7,5-8,0 и содержит бикарбонаты (HCO_3^-). С секретом поджелудочной железы в кишечник поступает панкреатическая α-амилаза. Этот фермент гидролизует α-1,4-гликозидные связи в крахмале и декстринах.

Продукт переваривания крахмала на этом этапе – дисахарид мальтоза, содержащая 2 остатка глюкозы, связанных α-1,4-связью. Из тех остатков глюкозы, которые находятся в местах разветвления и соединены α-1,6-гликозидной связью, образуется дисахарид изомальтоза. Кроме того, образуются олигосахариды, содержащие 3-8 остатков глюкозы, связанных α-1,4 и α-1,6-связями (рис. 16.6).

α-Амилаза поджелудочной железы (так же, как и α-амилаза слюны) действует как эндогликозидаза. Панкреатическая α-амилаза не расщепляет α-1,6-гликозидные связи в крахмале. Этот фермент также не гидролизует β-1,4-гликозидные связи, которыми соединены остатки глюкозы в молекуле целлюлозы. Целлюлоза, таким образом, проходит через кишечник неизменённой. Тем не менее, непереваренная целлюлоза выполняет важную функцию балластного вещества, придавая пище дополнительный объём и положительно влияя на процесс переваривания. Кроме того, в толстом кишечнике целлюлоза может подвергаться действию бактериальных ферментов и частично расщепляться с образованием спиртов, органических кислот и CO_2 . Продукты бактериального расщепления целлюлозы важны, как стимуляторы перистальтики кишечника.

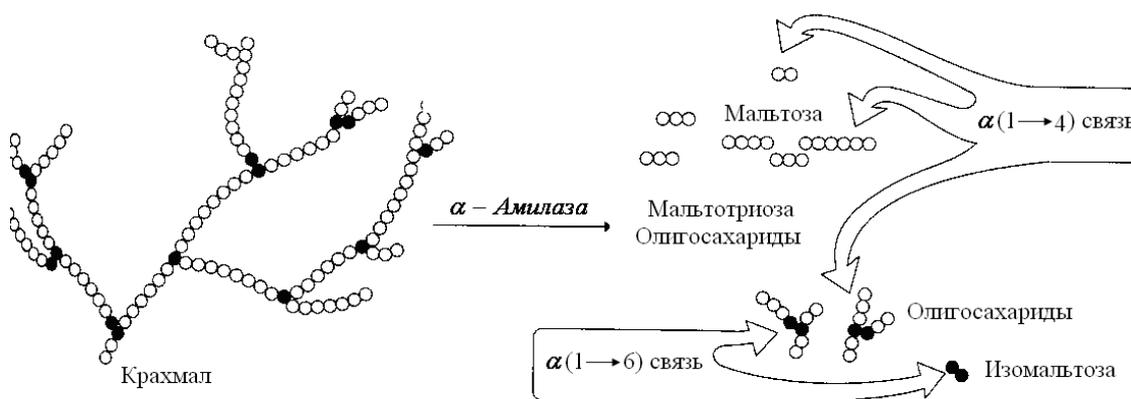


Рис. 16.6. Гидролиз крахмала панкреатической α-амилазой

Мальтоза, изомальтоза и трисахариды, образующиеся в верхних отделах кишечника из крахмала, – промежуточные продукты. Дальнейшее их переваривание происходит в тонком кишечнике под действием специфических ферментов. Сахароза и лактоза также гидролизуются специфическими дисахаридазами.

Особенность переваривания углеводов в тонком кишечнике заключается в том, что активность специфических олиго- и дисахаридаз в просвете кишечника низкая. Но ферменты активно действуют на поверхности эпителиальных клеток кишечника.

Тонкий кишечник изнутри имеет форму пальцеобразных выростов – ворсинок, покрытых эпителиальными клетками. Эпителиальные клетки, в свою очередь, покрыты микроворсинками, обращёнными в просвет кишечника. Эти клетки вместе с ворсинками образуют щётчатую каёмку, благодаря которой увеличивается поверхность контакта гидролитических ферментов и их субстратов в содержимом кишечника. На 1 мм² поверхности тонкой кишки у человека приходится 80-140 млн ворсинок.

Ферменты, расщепляющие гликозидные связи в дисахаридах – дисахаридазы, образуют ферментативные комплексы, локализованные на наружной поверхности цитоплазматической мембраны энтероцитов.

Сахарозо-изомальтазный комплекс

Этот ферментативный комплекс состоит из двух полипептидных цепей и имеет доменное строение. Сахарозо-изомальтазный комплекс прикрепляется к мембране микроворсинок кишечника с помощью гидрофобного (транс-мембранного) домена, образованного N-концевой частью полипептида. Каталитический центр выступает в просвет кишечника ([рис. 16.7](#)). Связь этого пищеварительного фермента с мембраной способствует эффективному поглощению продуктов гидролиза клеткой.

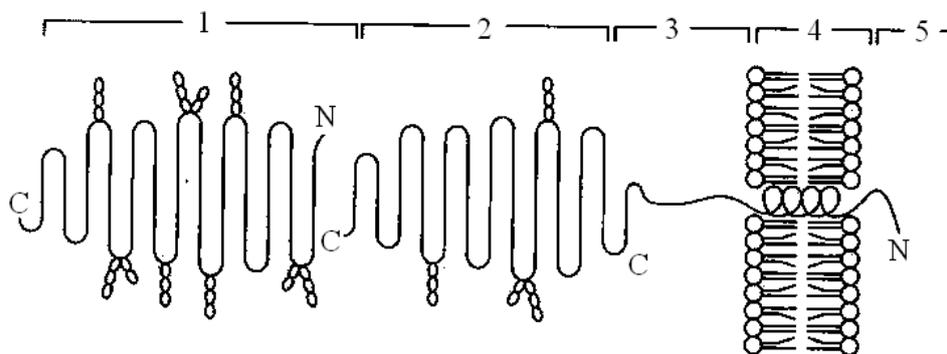


Рис. 16.7. Сахарозо-изомальтазный комплекс. 1 – сахараза; 2 – изомальтоза; 3 – связывающий домен; 4 – трансмембранный домен; 5 – цитоплазматический домен

Сахарозо-изомальтазный комплекс гидролизует сахарозу и изомальтозу, расщепляя α -1,2- и α -1,6-гликозидные связи. Кроме того, оба ферментных

домена имеют мальтазную и мальтотриазную активности, гидролизуя α -1,4-гликозидные связи в мальтозе и мальтотриозе (трисахарид, образующийся из крахмала). На долю сахарозо-изомальтазного комплекса приходится 80% от всей мальтазной активности кишечника. Но, несмотря на присущую ему высокую мальтазную активность, этот ферментативный комплекс назван в соответствии с основной специфичностью. К тому же сахарозная субъединица – единственный фермент, гидролизующий сахарозу в кишечнике. Изомальтазная субъединица с большей скоростью гидролизует гликозидные связи в изомальтозе, чем в мальтозе и мальтотриозе (рис. 16.8, рис. 16.9).

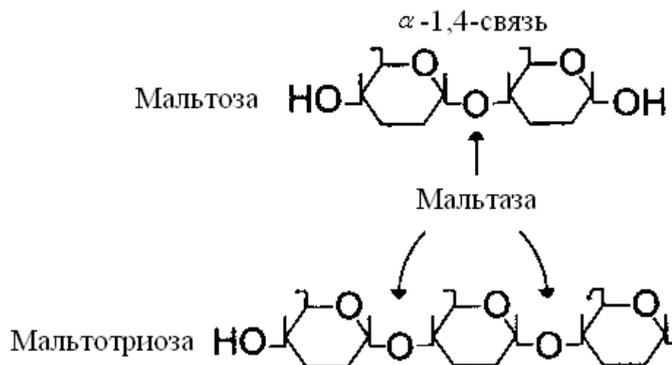


Рис. 16.8. Действие сахарозо-изомальтазного комплекса на мальтозу и мальтотриозу

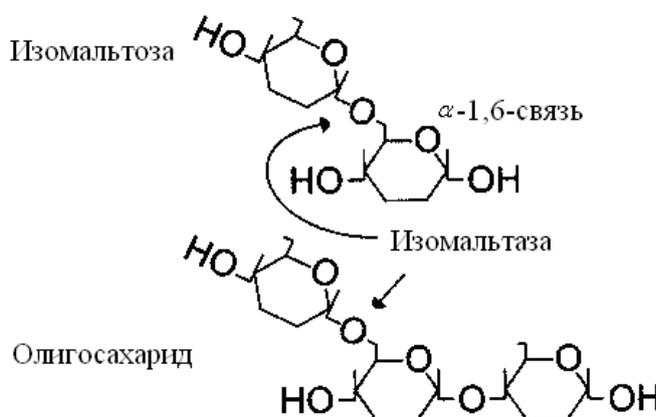


Рис. 16.9. Действие сахарозо-изомальтазного комплекса на изомальтозу и олигосахарид

В тощей кишке содержание сахарозо-изомальтазного ферментативного комплекса достаточно высокое, но оно снижается в проксимальной и дистальной частях кишечника.

Гликоамилазный комплекс

Этот ферментативный комплекс катализирует гидролиз α -1,4-связи между глюкозными остатками в олигосахаридах, действуя с восстанавливающего конца. По механизму действия этот фермент относят к экзогликози-

дазам. Комплекс расщепляет также связи в мальтозе, действуя как мальтаза. В гликоамилазный комплекс входят две разные каталитические субъединицы, имеющие небольшие различия в субстратной специфичности. Наибольшая гликоамилазная активность комплекса – в нижних отделах тонкого кишечника.

β-Гликозидазный комплекс (лактаза)

Лактаза расщепляет β-1,4-гликозидные связи между галактозой и глюкозой в лактозе (рис. 16.10).

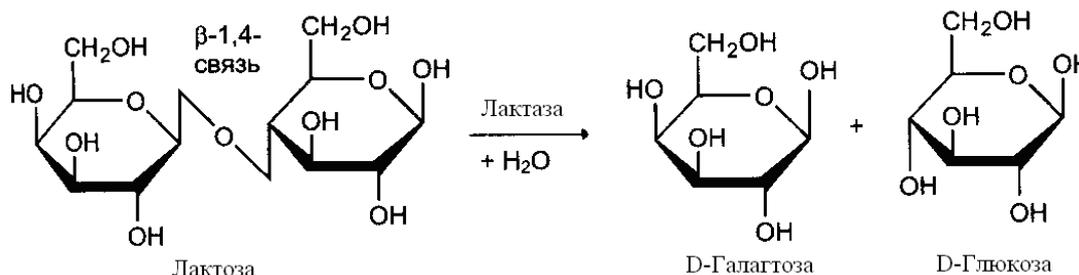


Рис. 16.10. Действие лактазы

По химической природе этот ферментативный комплекс является гликопротеином. Лактаза, как и другие гликозидазные комплексы, связана со щёточной каемкой и неравномерно распределена по всему тонкому кишечнику. Активность лактазы колеблется в зависимости от возраста. Так, у плода активность лактазы особенно повышена в поздние сроки беременности и сохраняется на высоком уровне до 5-7-летнего возраста. Затем активность фермента снижается, составляя у взрослых 10% от уровня активности, характерного для детей.

Трегалаза

Трегалаза – также гликозидазный комплекс, гидролизующий связи между мономерами в трегалозе (дисахариде, содержащемся в грибах). Трегалоza состоит из двух глюкозных остатков, связанных гликозидной связью между первыми аномерными атомами углерода (рис. 16.11).

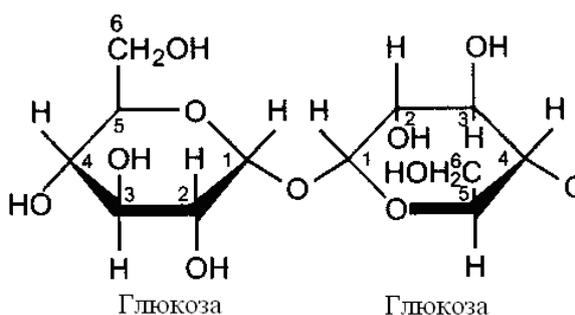


Рис. 16.11. Строение трегалозы

Совместное действие всех перечисленных ферментов завершает переваривание пищевых олиго- и полисахаридов с образованием моносахаридов, основной из которых – глюкоза. Кроме глюкозы, из углеводов пищи также образуются фруктоза и галактоза, в меньшем количестве □ манноза, ксилоза, арабиноза.

Всасывание моносахаридов в тонком кишечнике и их дальнейший транспорт. Глюкозные транспортеры

Моносахариды, образовавшиеся в результате переваривания, всасываются эпителиальными клетками тощей и подвздошной кишок с помощью специальных механизмов транспорта через мембраны этих клеток.

Всасывание моносахаридов в кишечнике

Транспорт моносахаридов в клетки слизистой оболочки кишечника может осуществляться разными способами: путём *облегчённой диффузии* и *активного транспорта*. В случае активного транспорта глюкоза и Na^+ проходят через мембраны с люминальной стороны, связываясь с разными участками белка-переносчика. При этом Na^+ поступает в клетку по градиенту концентрации и одновременно глюкоза транспортируется против градиента концентрации (*вторично-активный транспорт*). Следовательно, чем больше градиент Na^+ , тем больше поступление глюкозы в энтероциты. Если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости уменьшается, транспортирование глюкозы снижается. Градиент концентрации Na^+ , являющийся движущей силой активного симпорта, создаётся работой Na^+, K^+ -АТФазы. Перенос в клетки слизистой оболочки кишечника по механизму вторично-активного транспорта характерен также для галактозы.

При разной концентрации глюкозы в просвете кишечника «работают» различные механизмы транспорта. Благодаря активному транспорту эпителиальные клетки кишечника могут поглощать глюкозу при её очень низкой концентрации в просвете кишечника. Если же концентрация глюкозы в просвете кишечника велика, то она может транспортироваться в клетку путём облегченной диффузии. Таким же способом может всасываться и фруктоза. Следует отметить, что скорость всасывания глюкозы и галактозы гораздо выше, чем других моносахаридов. Способы транспорта моносахаридов через мембрану эпителиальных клеток кишечника представлены на [рис 16.12](#)

На [рис. 16.12](#) показано всасывание моносахаридов из кишечника путём облегчённой диффузии с помощью специальных белков-переносчиков (транспортёров). Кроме того, мы видим, что глюкоза и галактоза транспортируются в энтероцит путём вторично-активного транспорта, зависящего от градиента концентрации ионов натрия. Белки-транспортёры, зависящие от градиента Na^+ , обеспечивают всасывание глюкозы из просвета кишечника в энтероцит против градиента концентрации. Концентрация Na^+ , необходимая для этого, обеспечивается Na^+, K^+ -АТФазой, которая работает как насос, отка-

чивая из клетки Na^+ в обмен на K^+ . В отличие от глюкозы, фруктоза транспортируется системой, не зависящей от градиента натрия.

После всасывания моносахариды (главным образом, глюкоза) покидают клетки слизистой оболочки кишечника через мембрану, обращённую к кровеносному капилляру, с помощью облегченной диффузии. Часть глюкозы (более половины) через капилляры кишечных ворсинок попадает в кровеносную систему и по воротной вене доставляется в печень. Остальное количество глюкозы поступает в клетки других тканей.

Транспорт глюкозы из крови в клетки

Потребление глюкозы клетками из кровотока происходит также путём облегчённой диффузии. Следовательно, скорость трансмембранного потока глюкозы зависит только от градиента её концентрации. Исключение составляют клетки мышц и жировой ткани, где облегчённая диффузия регулируется инсулином (гормон поджелудочной железы).

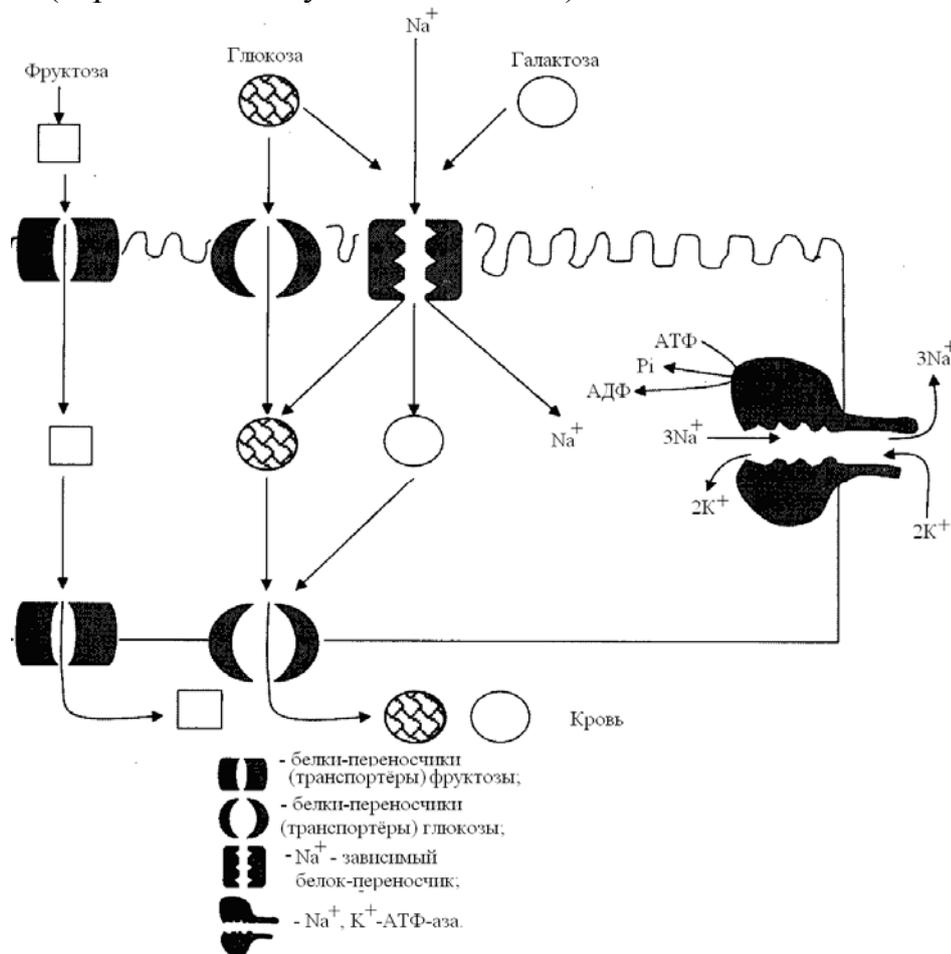


Рис. 16.12. Всасывание углеводов в кишечнике

В отсутствие инсулина плазматическая мембрана этих клеток непроницаема для глюкозы, т. к. она не содержит белков-переносчиков (транспортёров) глюкозы. *Транспортёры глюкозы называют также рецепторами глю-*

козы. Например, описан транспортёр глюкозы, выделенный из эритроцитов. Это трансмембранный белок, полипептидная цепь которого построена из 492 аминокислотных остатков и имеет доменную структуру. Полярные домены белка расположены по разные стороны от мембраны, гидрофобные располагаются в мембране, пересекая её несколько раз. Транспортёр имеет участок связывания глюкозы на внешней стороне мембраны. После присоединения глюкозы конформация белка изменяется, в результате чего глюкоза оказывается связанной с белком в участке, обращённом внутрь клетки. Затем глюкоза отделяется от транспортёра, переходя внутрь клетки.

Считают, что способ облегчённой диффузии по сравнению с активным транспортом предотвращает транспорт ионов вместе с глюкозой, если она транспортируется по градиенту концентрации.

Глюкозные транспортёры (ГЛЮТ) обнаружены во всех тканях. Существует несколько их разновидностей (табл. 16.1). Они пронумерованы в соответствии с порядком обнаружения.

Таблица 16.1.

Распределение белков-транспортёров глюкозы (ГЛЮТ)

Типы ГЛЮТ	Локализация в органах
ГЛЮТ-1	Преимущественно в мозге, плаценте, почках, толстом кишечнике
ГЛЮТ-2	Преимущественно в печени, почках, β -клетках островков Лангерганса, энтероцитах
ГЛЮТ-3	Во многих тканях, включая мозг, плаценту, почки
ГЛЮТ-4 (инсулинзависимый)	В мышцах (скелетной, сердечной), жировой ткани Содержится в отсутствие инсулина почти полностью в цитоплазме
ГЛЮТ-5	В тонком кишечнике. Возможно, является переносчиком фруктозы

Структура белков семейства ГЛЮТ отличается от белков, транспортирующих глюкозу через мембрану в кишечнике и почках против градиента концентрации.

Описанные типы ГЛЮТ имеют сходные первичную структуру и доменную организацию.

ГЛЮТ-1 обеспечивает стабильный поток глюкозы в мозг;

ГЛЮТ-2 обнаружен в клетках органов, выделяющих глюкозу в кровь. Именно при его участии глюкоза переходит в кровь из энтероцитов и печени. Он участвует в транспорте глюкозы в β -клетки поджелудочной железы;

ГЛЮТ-3 обладает большим, чем ГЛЮТ-1, сродством к глюкозе. Также обеспечивает постоянный приток глюкозы к клеткам нервной и других тканей;

ГЛЮТ-4 – главный переносчик глюкозы в клетки мышц и жировой ткани;

ГЛЮТ-5 встречается главным образом в клетках тонкого кишечника. Его функции известны недостаточно.

Все типы ГЛЮТ могут находиться как в плазматической мембране, так и в цитозольных везикулах. ГЛЮТ-4 (и в меньшей мере ГЛЮТ-1) почти полностью находятся в цитоплазме клеток. Влияние инсулина на такие клетки приводит к перемещению везикул, содержащих ГЛЮТ, к плазматической мембране, слиянию с ней и встраиванию транспортёров в мембрану. После чего возможен облегчённый транспорт глюкозы в эти клетки. После снижения концентрации инсулина в крови транспортёры глюкозы снова перемещаются в цитоплазму и поступление глюкозы в клетку прекращается (рис. 16.13).

Из рис. 16.13 видно, что на первом этапе происходит связывание инсулина с рецептором; на втором участок инсулинового рецептора, обращённый внутрь клетки, стимулирует перемещение транспортёров глюкозы. На третьем и четвёртом транспортёры в составе содержащих их везикул перемещаются к плазматической мембране клетки, включаются в её состав и переносят глюкозу в клетку.

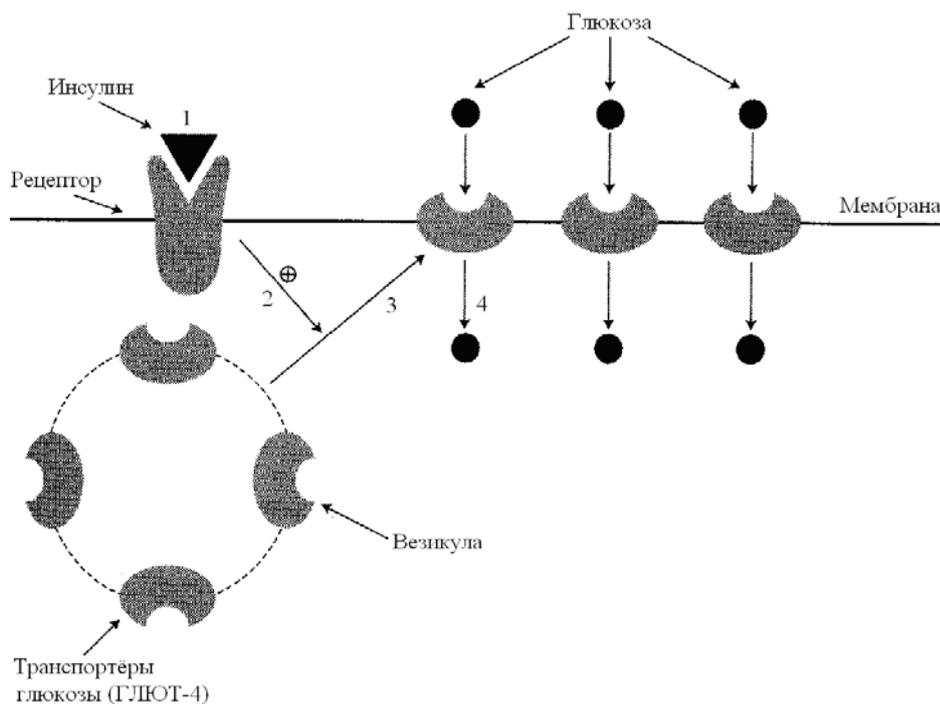


Рис. 16.13 Влияние инсулина на перемещение транспортёров глюкозы из цитоплазмы в плазматическую мембрану: 1 – 5 – этапы действия инсулина

Перемещение глюкозы из первичной мочи в клетки почечных канальцев происходит путём вторично-активного транспорта, подобно тому, как это осуществляется при всасывании глюкозы из просвета кишечника в энтероциты. Благодаря этому глюкоза может поступать в клетки даже в том случае, если её концентрация в первичной моче меньше, чем в клетках. При этом глюкоза реабсорбируется из первичной мочи почти полностью (99%).

Известны различные нарушения в работе транспортёров глюкозы. Наследственный дефект этих белков может лежать в основе инсулиннезависимого сахарного диабета. В то же время причиной нарушения работы транспортёра глюкозы может быть не только дефект самого белка. Нарушения функции ГЛЮТ-4 возможны на следующих этапах:

- передача сигнала инсулина о перемещении этого транспортёра к мембране;
- перемещение транспортёра в цитоплазме;
- включение в состав мембраны;
- отшнуровывание от мембраны и т.д.

Лекция 17

Анаэробный катаболизм углеводов

Анаэробное окисление глюкозы. Гликолиз. Внутриклеточная локализация процесса

Гликолиз (от гр. *glycus* – сладкий + *lysis* – растворение, распад) – это последовательность ферментативных реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием АТФ.

При аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до CO₂ и H₂O. Если содержание кислорода недостаточно, как, например, в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат. Таким образом, гликолиз – это не только главный путь утилизации глюкозы в клетках, но и уникальный путь, поскольку он может использовать кислород, если последний доступен (аэробные условия), но может протекать и в его отсутствие (анаэробные условия). Кроме того, на промежуточных стадиях образуются трехуглеродные фрагменты, которые используются для биосинтеза ряда веществ.

Анаэробный гликолиз – сложный ферментативный процесс распада глюкозы, протекающий в тканях человека и животных без потребления кислорода. Конечным продуктом гликолиза является молочная кислота. В процессе гликолиза образуется АТФ. Суммарное уравнение гликолиза можно представить следующим образом:

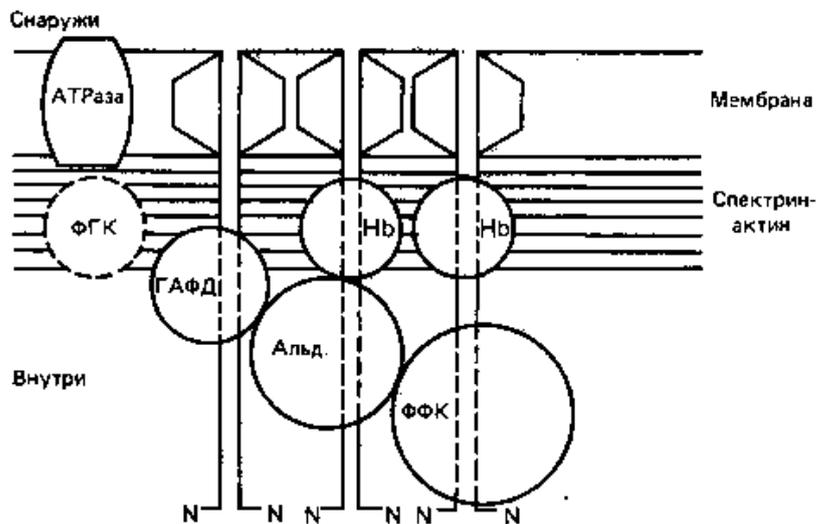


В анаэробных условиях гликолиз – единственный процесс в животном организме, поставляющий энергию. Именно благодаря ему организм человека и животных определенный период может осуществлять ряд физиологических функций в условиях недостаточности кислорода.

Внутриклеточно гликолиз локализуется в цитоплазматическом компартменте. При этом установлено, что гликолитические ферменты способны связываться с мышечными белками. На долю F-актина приходится больше связанных ферментов гликолиза, чем на долю миозина, актомиозина или белков стромы. Из ферментов наибольшим сродством к F-актину обладает альдолаза и несколько меньшим – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФДГ). Среди других ферментов, проявляющих определенную склонность к связыванию, необходимо отметить фосфофруктокиназу (ФФК), 3-фосфоглицераткиназу, пируваткиназу (ПК) и лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

Доказано существование надмолекулярной структурной организации основных ферментов на внутренней стороне мембраны эритроцитов. Предполагаемая схема расположения гликолитических ферментов на мембране эритроцитов представлена на [рис. 17.1](#). Димеры белка третьей полосы представлены как погруженные в мембрану гексагональные структуры. Их N-концы формируют в липидном бислое каналы для анионов и выступают в цитоплазму. Поскольку тетрамеры спектрина, прикрепленные к мономерам актина, оставляют свободными достаточно большие участки на поверхности мембраны, предполагают, что сквозь эту сеть могут проникать ферменты, гемоглобин и белок третьей полосы. На [рис. 17.1](#) в масштабе изображены только ферменты и гемоглобин: они представлены сечениями сфер, объемы которых пропорциональны соответствующим молекулярным массам.

а



б

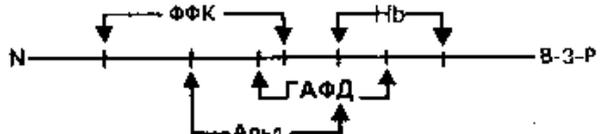
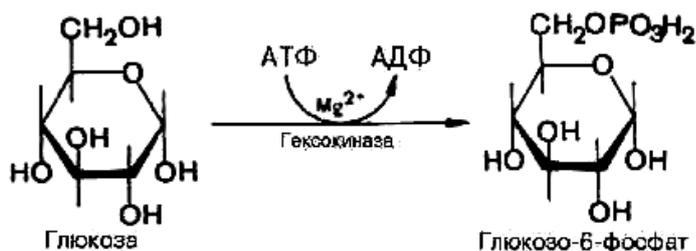


Рис. 17.1. Расположение гликолитических ферментов на мембране эритроцитов: а – общая схема расположения; б – примерное расположение участков связывания некоторых белков на N-конце белка третьей полосы

**Отдельные реакции гликолиза, их термодинамические характеристики.
Образование 2,3-дифосфоглицерата в шунте Рапопорта-Люберинга**

Процесс гликолиза катализируется одиннадцатью ферментами, большинство из которых выделено в гомогенном, кристаллическом или высокоочищенном виде и свойства которых достаточно известны.

Первой ферментативной реакцией гликолиза является фосфорилирование, т.е. перенос остатка ортофосфата на глюкозу за счет АТФ. Реакция катализируется ферментом гексокиназой:



Образование глюкозо-6-фосфата в гексокиназной реакции сопровождается освобождением значительного количества свободной энергии системы и может считаться практически необратимым процессом.

Наиболее важным свойством гексокиназы является ее ингибирование глюкозо-6-фосфатом, который служит одновременно и продуктом реакции, и аллостерическим ингибитором.

Гексокиназа имеет высокое сродство (низкую K_m) к своему субстрату – глюкозе; ее функция состоит в том, чтобы обеспечить захват тканью глюкозы даже при низких концентрациях последней в крови. Фосфорилируя практически всю поступающую в клетку глюкозу, гексокиназа поддерживает значительный градиент концентрации глюкозы между кровью и внутриклеточной средой. Фермент действует как на α -, так и на β -аномеры глюкозы; он фосфорилирует также и другие гексозы (в частности, D-фруктозы, D-маннозы и т.д.), но со значительно меньшей скоростью.

В печени кроме гексокиназы существует фермент глюкокиназа, который катализирует фосфорилирование только D-глюкозы. В мышечной ткани этот фермент отсутствует. Функция глюкокиназы состоит в «захватывании» глюкозы из кровотока после приема пищи (когда концентрация глюкозы в крови повышается). В отличие от гексокиназы она имеет высокое значение K_m для глюкозы и эффективно функционирует при концентрации глюкозы в крови выше 100 мг/100 мл. Глюкокиназа специфична только к глюкозе.

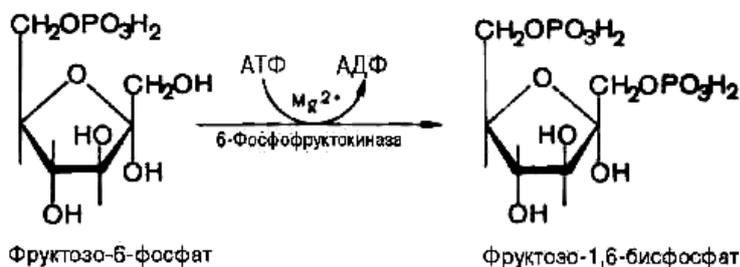
Глюкозо-6-фосфат занимает важное положение в области стыковки ряда метаболических путей (гликолиз, глюконеогенез, пентозофосфатный путь, гликогенез и гликогенолиз).

Второй реакцией гликолиза является превращение глюкозо-6-фосфата под действием фермента глюкозо-6-фосфат-изомеразы во фруктозо-6-фосфат:



Эта реакция протекает легко в обоих направлениях, и для нее не требуется каких-либо кофакторов.

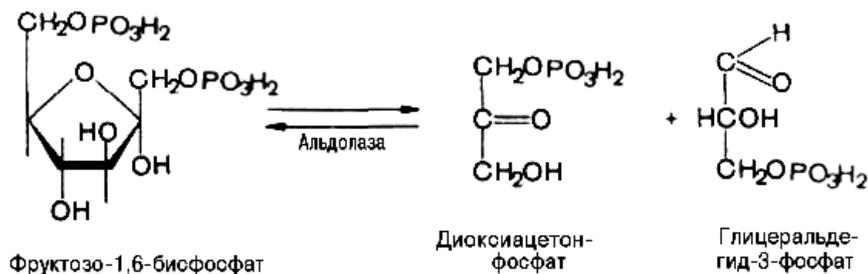
Третья реакция катализируется ферментом фосфофруктокиназой; образовавшийся фруктозо-6-фосфат вновь фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ:



Аналогично гексокиназной данная реакция практически необратима, протекает в присутствии ионов магния и является самой медленной реакцией гликолиза. Фактически эта реакция определяет скорость гликолиза в целом.

Фосфофруктокиназа относится к числу аллостерических ферментов. Она ингибируется АТФ и стимулируется АМР. При значительных величинах отношения АТФ/АМР активность фосфофруктокиназы угнетается и гликолиз замедляется. Напротив, при снижении этого коэффициента интенсивность гликолиза повышается. Так, в неработающей мышце активность фосфофруктокиназы низка, концентрация АТФ относительно высокая. Во время работы мышцы происходит интенсивное потребление АТФ, активность фосфофруктокиназы повышается, что приводит к усилению процесса гликолиза.

Четвертую реакцию гликолиза катализирует фермент альдолаза. Под его влиянием фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется на две фосфотриозы:



Эта реакция обратима. В зависимости от температуры равновесие устанавливается на различном уровне. При повышении температуры реакция сдвигается в сторону большего образования триозофосфатов (дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата).

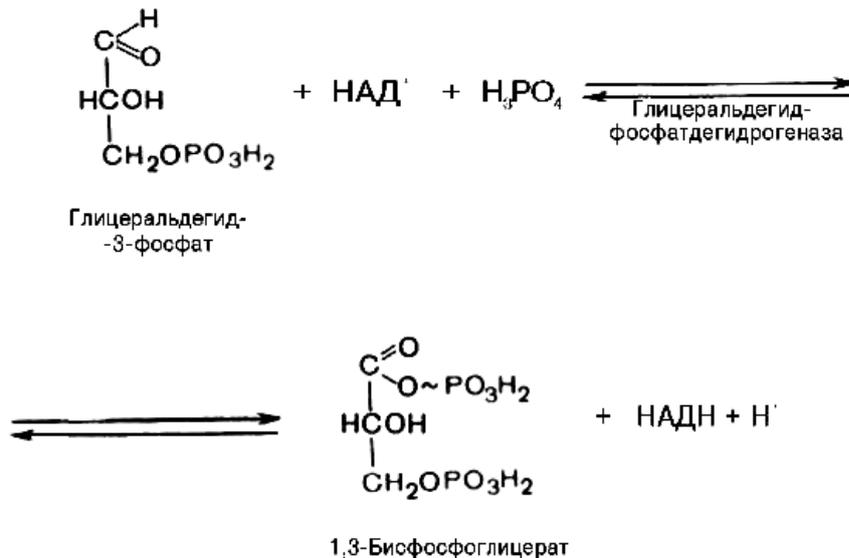
Пятая реакция – это реакция изомеризации триозофосфатов. Она катализируется ферментом триозофосфатизомеразой:



Равновесие данной изомеразной реакции сдвинуто в сторону дигидроксиацетонфосфата: 95% дигидроксиацетонфосфата и около 5% глицеральдегид-3-фосфата. В последующие реакции гликолиза может непосредственно включаться только один из двух образующихся триозофосфатов, а именно глицеральдегид-3-фосфат. Вследствие этого в ходе дальнейших превращений альдегидной формы фосфотриозы дигидроксиацетонфосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат.

Образованием глицеральдегид-3-фосфата завершается первая стадия гликолиза. Вторая стадия – наиболее сложная и важная. Она включает окислительно-восстановительную реакцию (реакцию гликолитической оксидоредукции), сопряженную с субстратным фосфорилированием, в процессе которого образуется АТФ.

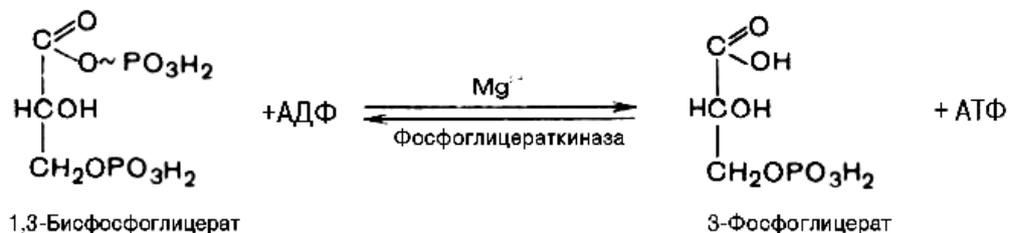
В результате шестой реакции глицеральдегид-3-фосфат в присутствии фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, кофермента NAD^+ и неорганического фосфата подвергается своеобразному окислению с образованием 1,3-бисфосфоглицериновой кислоты и восстановленной формы NAD (NADH). В структурном плане фермент состоит из четырех идентичных полипептидов, образующих тетрамер. Каждый полипептид содержит по четыре SH-группы, принадлежащие остаткам цистеина. Одна из них находится в активном центре фермента. Полагают, что она принимает участие в окислении глицеральдегид-3-фосфата. Сначала субстрат соединяется с остатком цистеина дегидрогеназы, образуя тиополуацеталь, который окисляется в тиоловый эфир; атомы водорода, отщепленные при этом окислении, переносятся на связанный с ферментом NAD^+ . Образующийся NADH связан с ферментом менее прочно, чем NAD^+ , и поэтому легко замещается другой молекулой NAD^+ . Реакция завершается фосфорилированием тиоэфирной связи с присоединением неорганического фосфата; при этом образуются 1,3-бисфосфоглицерат и свободный фермент с SH-группой:



Потенциальная энергия процесса окисления резервируется сначала в высокоэнергетической тиоэфирной связи, а после фосфорилиза – в фосфатной связи 1,3-бисфосфоглицерата, находящейся в положении 1.

1,3-Бисфосфоглицерат представляет собой высокоэнергетическое соединение (макроэргическая связь условно обозначена знаком «тильда» ~). Механизм действия глицеральдегидфосфатдегидрогеназы сводится к следующему: в присутствии неорганического фосфата NAD^+ выступает как акцептор водорода, отщепляющегося от глицеральдегид-3-фосфата. В процессе образования NADH глицеральдегид-3-фосфат связывается с молекулой фермента за счет SH-групп последнего. Образовавшаяся связь богата энергией, но она непрочна и поэтому расщепляется под влиянием неорганического фосфата; при этом образуется 1,3-бисфосфоглицериновая кислота.

Седьмая реакция катализируется фосфоглицераткиназой; при этом происходит передача богатой энергией фосфатного остатка (фосфатной группы в положении 1) на ADP с образованием ATP и 3-фосфоглицериновой кислоты (3-фосфоглицерат):



Таким образом, благодаря действию двух ферментов (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и фосфоглицераткиназы) энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата до карбоксильной группы, запасается в форме энергии ATP . В отличие от окислительного фосфорилирования образование ATP из высокоэнергетических соединений называется субстратным фосфорилированием.

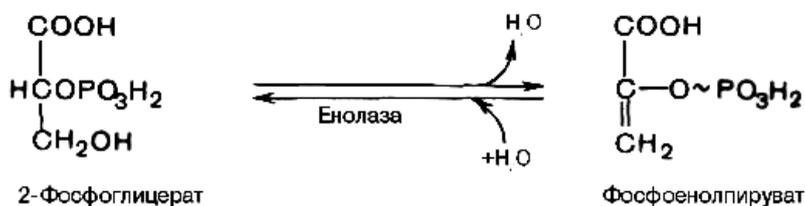
Важной отличительной особенностью гликолиза в эритроцитах является то, что 1,3-бифосфоглицерат может превращаться в 2,3-бифосфоглицерат, который является аллостерическим эффектором, понижающим сродство гемоглобина к кислороду (рис. 17.2). Открытый в 1950 г. Рапопортом и Люберингом шунт находится под жестким контролем и снабжает эритроциты аллостерическим эффектором в таких количествах, которые диктуются метаболическим состоянием организма. При дефиците кислорода синтез 2,3-бифосфоглицерата усиливается. Эффектор связывается с четырьмя субъединицами тетрамера гемоглобина и уменьшает сродство к O_2 в результате стабилизации дезоксиформы. Это в свою очередь приводит к увеличению выхода кислорода из эритроцитов в ткани и улучшению снабжения клеток кислородом.

Восьмая реакция сопровождается внутримолекулярным переносом оставшейся фосфатной группы, и 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту (2-фосфоглицерат).

Реакция легкообратима, протекает в присутствии ионов Mg^{2+} . Кофактором фермента является также 2,3-бисфосфоглицериновая кислота аналогично тому, как в фосфоглюкомутазной реакции роль кофактора выполняет глюкозо-1,6-бисфосфат:



Девятая реакция катализируется ферментом енолазой, при этом 2-фосфоглицериновая кислота в результате отщепления молекулы воды переходит в фосфоенолпировиноградную кислоту (фосфоенолпируват), а фосфатная связь в положении 2 становится высокоэнергетической:



Енолаза активируется двухвалентными катионами Mg^{2+} или Mn^{2+} и ингибируется фторидом.

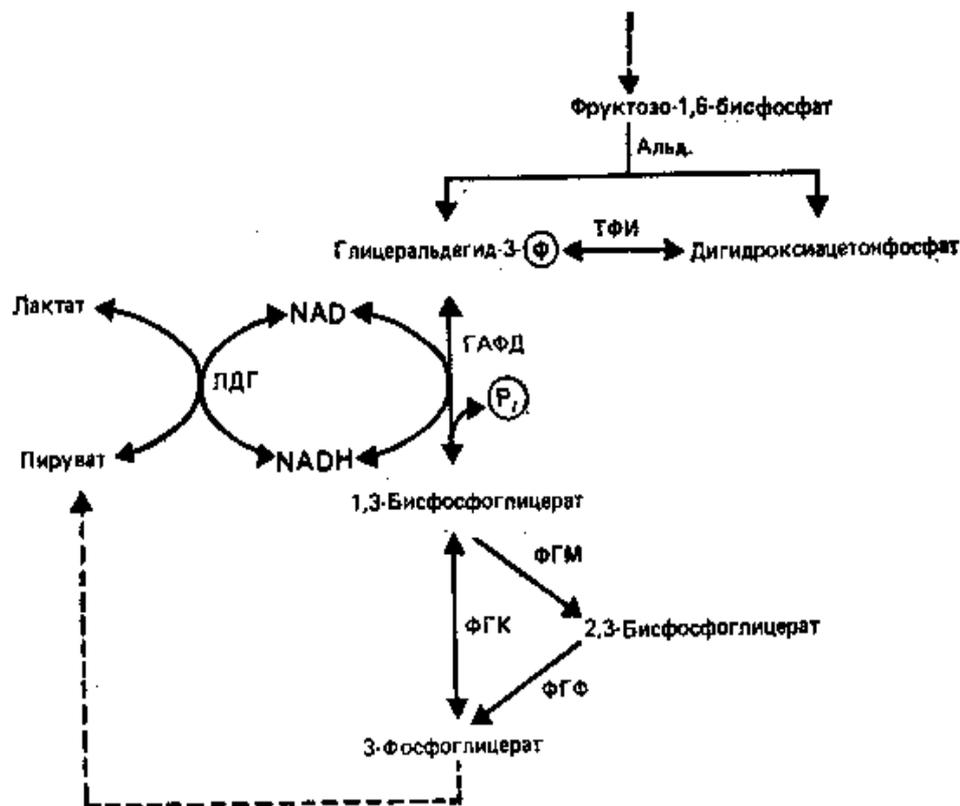


Рис. 17.2. Часть системы гликолиза эритроцитов, включающей реакцию обмена NAD-NADH и 2,3-бисфосфоглицератный цикл. Условные обозначения: Альд. – альдолаза, ФГК – фосфоглицераткиназа; ФГМ – фосфоглицератмутаса; ФГФ – фосфоглицератфосфатаза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ТФИ – триозофосфатизомераза.

Десятая реакция характеризуется разрывом высокоэнергетической связи и переносом фосфатного остатка от фосфоенолпирувата на ADP (субстратное фосфорилирование). Катализируется ферментом пируваткиназой:



Для действия пируваткиназы необходимы ионы Mg^{2+} , а также одновалентные катионы щелочных металлов (K^+ или др.). Внутри клетки реакция является практически необратимой.

В результате одиннадцатой реакции происходит восстановление пирувиноградной кислоты и образование молочной кислоты. Реакция протекает при участии фермента лактатдегидрогеназы и кофермента NADH, образовавшегося в шестой реакции:



Реакцией восстановления пирувата полностью завершается внутренний окислительно-восстановительный цикл гликолиза. NAD^+ при этом играет роль промежуточного переносчика водорода от глицеральдегид-3-фосфата (6-я реакция) на пировиноградную кислоту (11-я реакция), при этом сам он регенерируется и вновь может участвовать в циклическом процессе, получившем название гликолитической оксидоредукции.

Биологическое значение процесса гликолиза заключается прежде всего в образовании богатых энергией фосфорных соединений. На первых стадиях гликолиза затрачивается две молекулы АТФ (гексокиназная и фосфофруктокиназная реакции). На последующих образуются четыре молекулы АТФ (фосфоглицераткиназная и пируваткиназная реакции). Таким образом, энергетическая эффективность гликолиза в анаэробных условиях составляет две молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы. Термодинамические характеристики реакций гликолиза представлены в [табл. 17.1](#).

Как отмечалось, основной реакцией, лимитирующей скорость гликолиза, является фосфофруктокиназная. Вторая реакция, лимитирующая скорость и регулирующая гликолиз, – гексокиназная реакция. Кроме того, контроль гликолиза осуществляется также лактатдегидрогеназы и ее изоферментами.

В тканях с аэробным метаболизмом (ткани сердца, почек и др.) преобладают изоферменты ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Они ингибируются даже небольшими концентрациями пирувата, что препятствует образованию молочной кислоты и способствует более полному окислению пирувата (точнее, ацетил-СоА) в цикле трикарбоновых кислот.

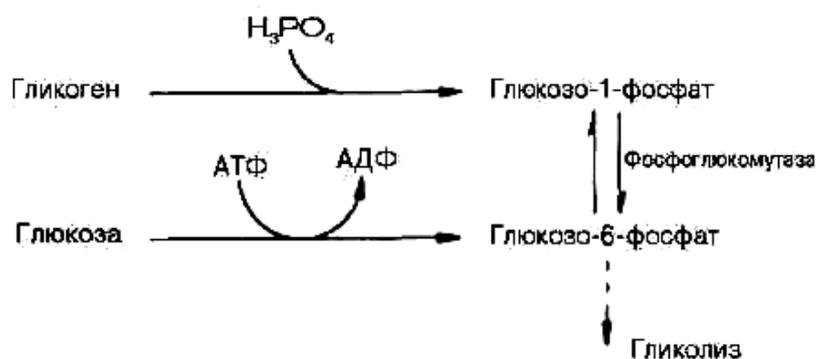
В тканях человека, в значительной степени использующих энергию гликолиза (например, скелетные мышцы), главными изоферментами являются ЛДГ₅ и ЛДГ₄. Активность ЛДГ₅ максимальна при тех концентрациях пирувата, которые ингибируют ЛДГ₁. Преобладание изоферментов ЛДГ₄ и ЛДГ₅ обуславливает интенсивный анаэробный гликолиз с быстрым превращением пирувата в молочную кислоту.

Термодинамические характеристики реакций гликолиза

№ реакции	Реакция	$\Delta G^{0'}$, кДж/моль
1	Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат + АДФ + H ⁺	-16,74
2	Глюкозо-6-фосфат ↔ Фруктозо-6-фосфат	+1,67
3	Фруктозо-6-фосфат + АТФ → Фруктозо-1,6-дифосфат + АДФ + H ⁺	-14,23
4	Фруктозо-1,6-дифосфат → Глицеральдегид-3-фосфат + Диоксиацетонфосфат	+23,85
5	Диоксиацетонфосфат ↔ Глицеральдегид-3-фосфат	+7,53
6	Глицеральдегид-3-фосфат + NAD ⁺ P _i ↔ 1,3-Дифосфоглицерат + NADH + H ⁺	+6,28
7	1,3-Дифосфоглицерат + АДФ ↔ 3-Фосфоглицерат + АТФ	-18,83
8	3-Фосфоглицерат ↔ 2-Фосфоглицерат	+4,6
9	2-Фосфоглицерат ↔ Фосфоенолпируват + H ₂ O	+1,67
10	Фосфоенолпируват + АДФ + H ⁺ → Пируват + АТФ	-31,38

Расщепление гликогена (гликогенолиз). Строение, механизм действия и регуляция гликогенфосфорилазы

Гликогенолиз – процесс анаэробного распада гликогена. Вовлечение D-глюкозных единиц гликогена в процесс гликолиза происходит при участии двух ферментов: фосфорилазы *a* и фосфоглюкомутазы. Образовавшийся в результате фосфоглюкомутазной реакции глюкозо-6-фосфат может включаться в процесс гликолиза. После образования глюкозо-6-фосфата дальнейшие пути гликолиза и гликогенолиза полностью совпадают:



В процессе гликогенолиза в виде макроэргических соединений накапливаются не две, а три молекулы АТФ (АТФ не тратится на образование глюкозо-6-фосфата). Кажется, что энергетическая эффективность гликогенолиза

выглядит несколько более высокой по сравнению с процессом гликолиза, но эта эффективность реализуется только при наличии активной фосфорилазы *a*. Следует иметь в виду, что в процессе активации фосфорилазы *b* расходуется АТФ.

Гликоген-фосфорилаза катализирует последовательное удаление гликозильных остатков с невосстанавливающего конца молекулы гликогена. Ортофосфат расщепляет гликозидную связь между C₁ концевой остатка и C₄ соседнего остатка. Он специфически разрывает связь между углеродным атомом C₁ и гликозидным атомом кислорода с сохранением α-конфигурации при C₁.

Реакция, катализируемая фосфорилазой, *in vitro* легко обратима. При рН 6,8 равновесное отношение ортофосфата к глюкозо-1-фосфату равно 3,6. ΔG⁰ для этой реакции мало, потому что гликозидная связь замещается фосфоэфирной, которая имеет почти такой же потенциал переноса. Однако *in vivo* фосфоролиз сдвинут далеко в сторону распада гликогена, поскольку отношение [P_i]/[Глюкозо-1-фосфат] обычно превышает 100.

Фосфорилаза скелетных мышц существует в двух взаимопревращающихся формах: активная фосфорилаза *a* и обычно неактивная фосфорилаза *b* (рис. 17.3).

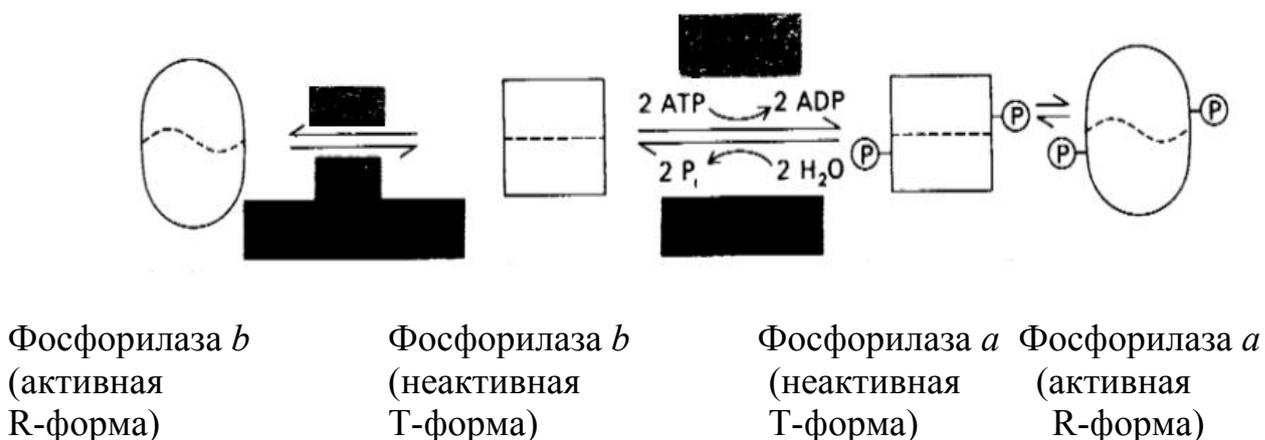


Рис. 17.3. Регуляции гликоген-фосфорилазы в скелетных мышцах

Фермент может принимать каталитически неактивную T (напряженную) конформацию или активную R (релаксированную) конформацию. Равновесие R↔T для фосфорилазы *a* сдвинуто далеко в сторону активного R-состояния. В противоположность этому фосфорилаза *b* находится преимущественно в неактивном T-состоянии, исключая случаи, когда содержание АМР находится на высоком уровне, а содержание АТФ и глюкозо-6-фосфата – на низком. При большинстве физиологических состояний доля активного фермента определяется скоростями фосфорилирования и дефосфорилирования. Фермент представляет собою димер, молекулярная масса субъединиц которого равна 92 кДа. Фосфорилаза *b* превращается в фосфорилазу *a* путем фосфорилирования одного остатка серина (Ser-14) в каждой субъединице. Эта

ковалентная модификация катализируется специфическим ферментом *киназой фосфорилазы*, которая была открыта Эдмондом Фишером и Эдвином Кребсом. Фосфорилаза *a* инактивируется специфической фосфатазой, гидролизующей фосфорильную группу, присоединенную к Ser-14.

Мышечная фосфорилаза *b* активна только в присутствии высоких концентраций АМР, действующих аллостерически. АМР связывается с центром связывания нуклеотида и изменяет конформацию фосфорилазы *b*. АТР действует как отрицательный аллостерический эффектор, конкурируя с АМР. Глюкозо-6-фосфат также ингибирует фосфорилазу *b* преимущественно путем связывания с другим активным центром. При большинстве физиологических состояний *фосфорилаза b* неактивна вследствие ингибирующего действия АТР и глюкозо-6-фосфата. В противоположность этому *фосфорилаза a* полностью активна независимо от содержания АМР, АТР и глюкозо-6-фосфата. Доля активного фермента определяется, прежде всего, скоростями фосфорилирования и дефосфорилирования. В неработающей мышце почти весь фермент находится в неактивной *b*-форме. Повышенное содержание адреналина и электростимуляция мышцы приводят к образованию активной *a*-формы.

Рентгенокристаллографические исследования *a*- и *b*-форм гликогенфосфорилазы значительно упростили изучение каталитических и регуляторных механизмов этого ключевого фермента метаболизма. Так, 841 аминокислотных остатков мономерной субъединицы компактно упакованы в три структурных домена ([рис. 17.4](#)): *аминоконцевой домен* (310 остатков), *гликоген-связывающий домен* (160 остатков) и *карбоксихонцевой домен* (371 остаток).

Каталитический центр локализован в глубокой щели, образованной остатками аминокислот каждого из этих трех доменов. Такая защита активного центра от водной среды должна, очевидно, благоприятствовать преобладанию фосфорилазы над гидролизом. *Пиридоксальфосфат* (витамин В₆), который необходим для действия фермента, связывается вблизи участка присоединения глюкозо-1-фосфата. Альдегидная группа этого кофактора образует шиффово основание с лизиновой боковой цепью С-концевого домена. Сохранение ферментативной активности после восстановления шиффова основания боргидридом говорит о том, что в данном случае альдегидная группа в отличие от случаев с другими другими пиридоксальными ферментами не участвует в катализе. В то же время фосфорильная группа пиридоксальфосфата, по-видимому, принимает прямое участие в катализе.

В молекуле фосфорилазы имеется также *участок связывания гликогена*, отстоящий от каталитического центра на 30 Å. Этот участок имеет важное значение для присоединения фермента к частице гликогена. Благодаря такому большому расстоянию между местом связывания гликогена и каталитическим центром фермент может осуществлять фосфорилиз многих концевых остатков, не претерпевая диссоциации и реассоциации после каждого каталитического цикла.

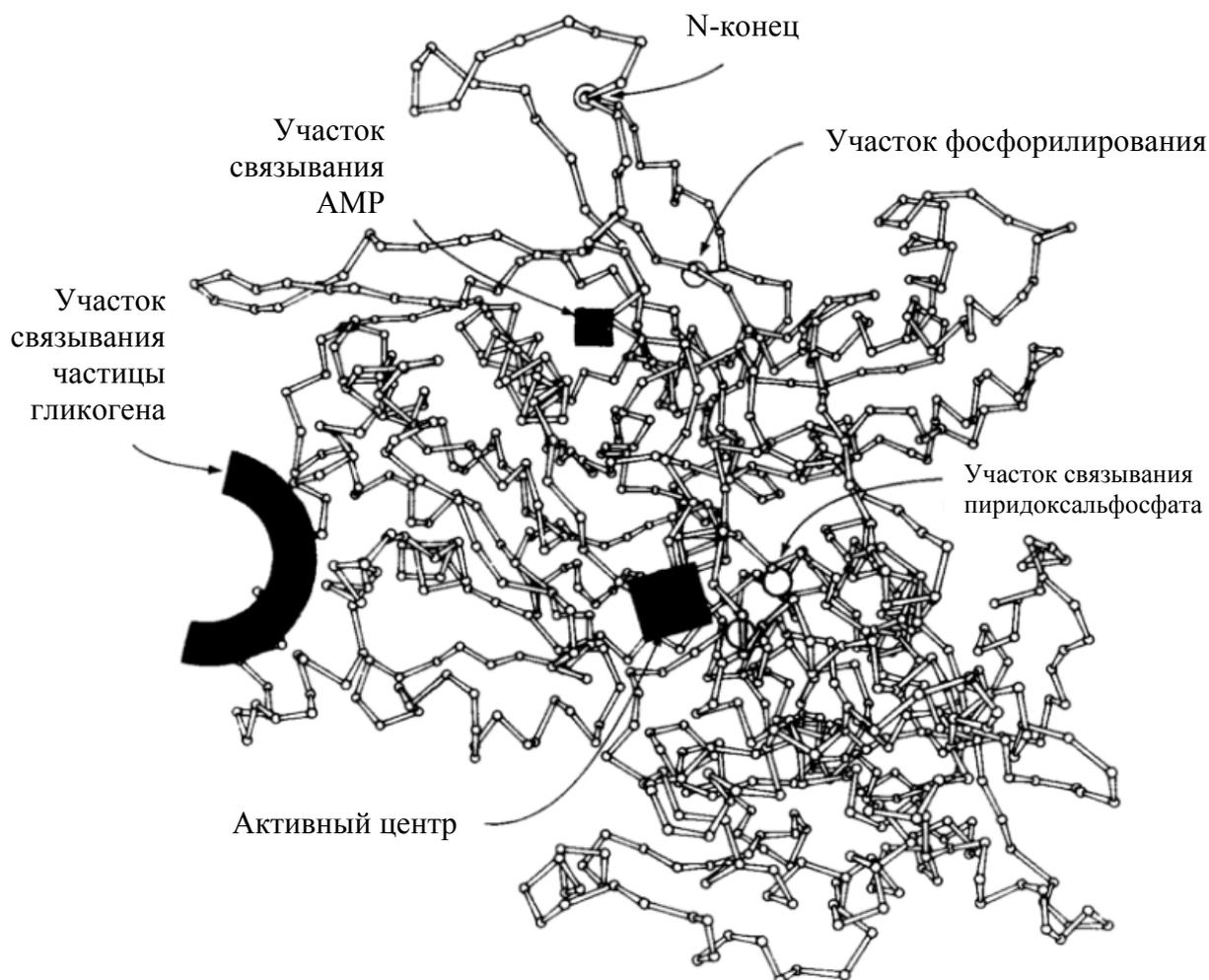


Рис. 17.4. α -углеродный остов фосфоорилазы *a*

Помимо этого фосфоорилаза содержит по меньшей мере два аллостерических участка контроля. Глюкоза и нуклеозиды, являющиеся аллостерическими ингибиторами печеночной фосфоорилазы *a*, связываются вблизи каталитического центра. АМР, аллостерический активатор фосфоорилазы *b*, связывается рядом с границей между субъединицами, далеко от каталитического центра и участка связывания гликогена.

Серин-14, место фосфорилирования при превращении фосфоорилазы *b* в фосфоорилазу *a*, также локализован вблизи границы между субъединицами. Эта фосфорильная группа в фосфоорилазе *a* соединена водородной связью с боковой цепью аргинина-69. В то же время область, охватывающая 19 N-концевых остатков в фосфоорилазе *b*, не имеет строго определенной структуры. Эта область *b*-формы по гибкости напоминает очень подвижный активационный домен в трипсиногене, который принимает строго упорядоченную конформацию при превращении в трипсин.

Активность киназы гликоген-фосфоорилазы также регулируется путем ковалентной модификации. Она подобно фосфоорилазе, в результате фосфорилирования превращается из формы с низкой активностью в высокоактив-

ную форму. Фермент, катализирующий эту активацию, является компонентом системы гормон-циклический АМР.

Киназа фосфоорилазы может быть частично активирована и другим путем (под действием Ca^{2+} в концентрациях порядка 10^{-7} М). Этот механизм активации имеет для биологических процессов важное значение, поскольку мышечное сокращение запускается высвобождением Ca^{2+} . Таким образом, *расщепление гликогена и мышечное сокращение связаны преходящим увеличением содержания Ca^{2+} в цитоплазме.*

Рассмотрим связь между гормонами, влияющими на обмен гликогена, и реакциями фосфорилирования, определяющими активности гликогенсинтазы и гликогенфосфоорилазы. При этом последовательность реакций следующая:

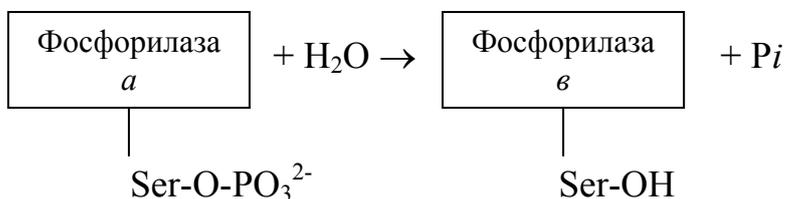
1) адреналин связывается с плазматической мембраной мышечной клетки и стимулирует аденилатциклазу;

2) аденилатциклаза катализирует образование циклического АМР из АТР;

3) повышенное внутриклеточное содержание циклического АМР активирует *протеинкиназу*. В отсутствие циклического АМР эта киназа неактивна, связывание циклического АМР приводит к ее аллостерической стимуляции;

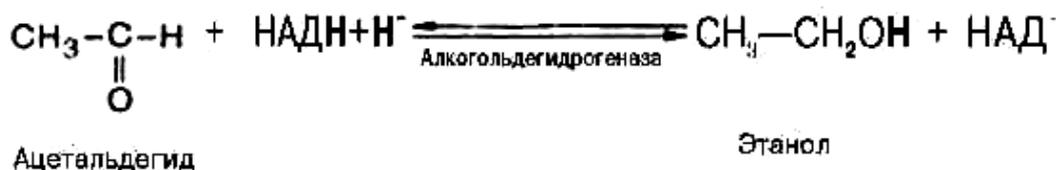
4) зависящая от циклического АМР протеинкиназа фосфорилирует киназу фосфоорилазы и гликогенсинтазу. *Фосфорилирование обоих ферментов лежит в основе координированной регуляции синтеза и расщепления гликогена.* Оно приводит к «включению» фосфоорилазы (при посредстве киназы фосфоорилазы) и к одновременному «выключению» гликогенсинтазы (прямым путем).

Изменения ферментативной активности, вызываемые фосфорилированием, могут быть обращены путем гидролитического удаления фосфорильной группы. Например, превращение фосфоорилазы *a* в фосфоорилазу *b* катализируется *фосфатазой фосфоорилазы*:



Данный фермент гидролизует также фосфорильную группу активной формы киназы фосфоорилазы, вызывая ее инактивацию. Кроме того, эта же фосфатаза удаляет фосфорильную группу из гликогенсинтазы *b*, превращая ее в значительно более активную *a*-форму. Таково еще одно молекулярное устройство, обеспечивающее координированный синтез и расщепление гликогена. Активность фосфатаз также, по-видимому, регулируется. Например, сочетание Ca^{2+} и Mg-АТР ингибирует фосфатазу фосфоорилазы, но активирует киназу фосфоорилазы. Фосфатаза гликогенсинтазы в мышцах и ингибирует-

Образовавшийся ацетальдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от NADH, восстанавливаясь при этом в этанол. Реакция катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой:



Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO₂, а не молочная кислота, как при гликолизе.

Процесс молочнокислого брожения имеет большое сходство со спиртовым брожением. Отличие заключается лишь в том, что при молочнокислом брожении пировиноградная кислота не декарбоксилируется, а, как и при гликолизе в животных тканях, восстанавливается при участии ЛДГ за счет водорода NADH.

Известны две группы молочнокислых бактерий. Бактерии одной группы в процессе брожения углеводов образуют только молочную кислоту, а бактерии другой из каждой молекулы глюкозы «производят» по одной молекуле молочной кислоты, этанола и CO₂.

Существуют и другие виды брожения, конечными продуктами которых могут являться пропионовая, масляная и янтарная кислоты, а также другие соединения.

Лекция 18

Аэробный катаболизм углеводов (часть 1)

Аэробный метаболизм пирувата. Митохондрии: структура и энергетические функции

Клетки, недостаточно снабжаемые кислородом, могут частично или полностью существовать за счет энергии гликолиза. Однако большинство животных и растительных клеток в норме находится в аэробных условиях и свое органическое «топливо» окисляет полностью (до CO₂ и H₂O). В этих условиях пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, не восстанавливается до лактата, а постепенно окисляется до CO₂ и H₂O в аэробной стадии катаболизма, при этом первоначально происходит окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-СоА.

Окислительное декарбоксилирование пирувата. Строение мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса. Суммарное уравнение и энергетический баланс окислительного декарбоксилирования пирувата. Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса: ковалентная модификация, аллостерический механизм

Окисление пирувата до ацетил-СоА происходит при участии ряда ферментов и коферментов, объединенных структурно в мультиферментную систему, получившую название «пируватдегидрогеназный комплекс».

На первой стадии этого процесса пируват (рис. 18.1) теряет свою карбоксильную группу в результате взаимодействия с тиаминпирофосфатом (ТРП) в составе активного центра фермента пируватдегидрогеназы (E_1). На второй стадии оксиэтильная группа комплекса E_1 -ТРП-СНОН-СН₃ окисляется с образованием ацетильной группы, которая одновременно переносится на амид липоевой кислоты (кофермент), связанной с ферментом дигидролипоилацетилтрансферазой (E_2). Этот фермент катализирует третью стадию – перенос ацетильной группы на коэнзим СоА (НСоА) с образованием конечного продукта (ацетил-СоА), который является высокоэнергетическим (макроэргическим) соединением.

На четвертой стадии регенерируется окисленная форма липоамида из восстановленного комплекса дигидролипоамида- E_2 . При участии фермента дигидролипоилдегидрогеназы (E_3) осуществляется перенос атомов водорода от восстановленных сульфгидрильных групп дигидролипоамида на FAD, который выполняет роль простетической группы данного фермента и прочно с ним связан. На пятой стадии восстановленный FADH₂ дигидролипоилдегидрогеназы передает водород на кофермент NAD⁺ (с образованием NADH + H⁺).

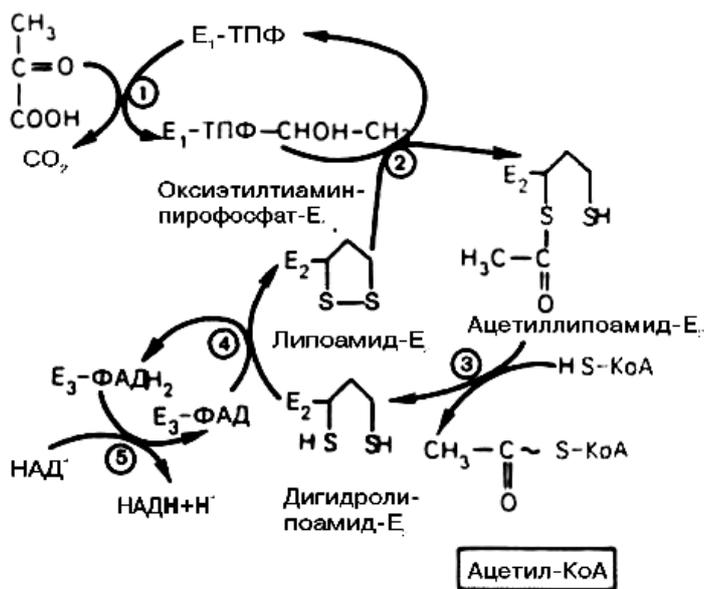


Рис. 18.1. Механизм действия пируватдегидрогеназного комплекса. E_1 – пируватдегидрогеназа; E_2 – дигидролипоилацетилтрансфераза; E_3 – дигидролипоилдегидрогеназа (цифры в кружках обозначают стадии процесса)

Процесс окислительного декарбоксилирования пирувата происходит в матриксе митохондрий. В нем (в составе сложного мультиферментного комплекса) принимают участие 3 фермента (пируватдегидрогеназа, дигидролипоилацетилтрансфераза, дигидролипоилдегидрогеназа) и 5 коферментов (TPP, амид липоевой кислоты, коэнзим А, FAD и NAD), из которых три относительно прочно связаны с ферментами (TPP-E₁, липоамид-E₂ и FAD-E₃), а два – легко диссоциируют (HS-CoA и NAD).

Все эти ферменты, имеющие субъединичное строение, и коферменты организованы в единый комплекс. Поэтому промежуточные продукты способны быстро взаимодействовать. Доказано, что полипептидные цепи субъединиц дигидролипоил-ацетилтрансферазы составляют как бы ядро комплекса, вокруг которого расположены пируватдегидрогеназа и дигидролипоилдегидрогеназа. Принято считать, что нативный ферментный комплекс образуется путем самосборки.

Суммарную реакцию, катализируемую пируватдегидрогеназным комплексом, можно представить следующим образом:



Реакция сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии и практически необратима ($\Delta G_0' = -40$ кДж/моль).

Образовавшийся в процессе окислительного декарбоксилирования ацетил-CoA подвергается дальнейшему окислению с образованием CO₂ и H₂O. Полное окисление ацетил-CoA происходит в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Этот процесс, так же как окислительное декарбоксилирование пирувата, происходит в митохондриях клеток.

Цикл лимонной кислоты. Отдельные реакции цикла, их термодинамические характеристики. Суммарное уравнение окисления ацетил-CoA в цикле Кребса

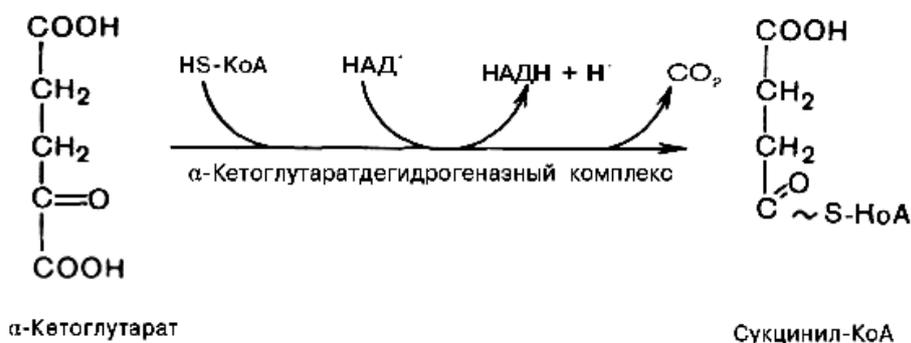
Цикл трикарбоновых кислот впервые был открыт английским биохимиком Г. Кребсом.

Он первым постулировал значение данного цикла для полного сгорания пирувата, главным источником которого является гликолитическое превращение углеводов. В дальнейшем было доказано, что цикл трикарбоновых кислот является тем центром, в котором сходятся практически все метаболические пути. Таким образом, цикл Кребса, – общий конечный путь окисления ацетильных групп (в виде ацетил-CoA), в которые в процессе катаболизма превращается большая часть органических молекул, играющих роль «клеточного топлива»: углеводов, жирных кислот и аминокислот.

Ацетил-CoA, образовавшийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата в митохондриях, вступает в цикл Кребса. Данный цикл происходит в матриксе митохондрий и состоит из восьми последовательных

В ходе изоцитратдегидрогеназной реакции изолимонная кислота одновременно декарбоксилируется. NAD^+ -зависимая изоцитратдегидрогеназа является аллостерическим ферментом, которому в качестве специфического активатора необходим ADP. Кроме того, фермент для проявления своей активности нуждается в ионах Mg^{2+} или Mn^{2+} .

Во время четвертой реакции происходит окислительное декарбоксилирование α -кетоглутаровой кислоты с образованием высокоэнергетического соединения сукцинил-КоА. Механизм этой реакции сходен с механизмом реакции окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА, α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс напоминает по своей структуре пируватдегидрогеназный комплекс. Как в одном, так и в другом случае в реакции принимают участие 5 коферментов: TPP, амид липоевой кислоты, HS-CoA, FAD и NAD^+ .



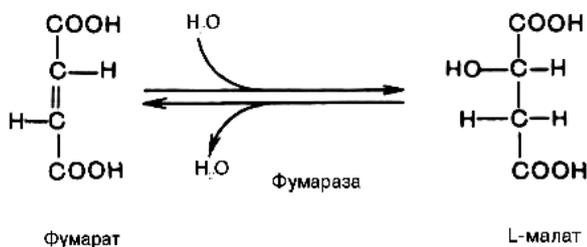
Пятая реакция катализируется ферментом сукцинил-КоА-синтетазой. В ходе этой реакции сукцинил-КоА при участии ГТФ и неорганического фосфата превращается в янтарную кислоту (сукцинат). Одновременно происходит образование высокоэнергетической фосфатной связи ГТФ за счет высокоэнергетической тиоэфирной связи сукцинил-КоА:



В результате шестой реакции сукцинат дегидрируется в фумаровую кислоту. Окисление сукцината катализируется сукцинатдегидрогеназой, в молекуле которой с белком прочно (ковалентно) связан кофермент FAD. В свою очередь сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной:



Седьмая реакция осуществляется под влиянием фермента фумаратгидратазы (фумаразы). Образовавшаяся при этом фумаровая кислота гидратируется, продуктом реакции является яблочная кислота (малат). Следует отметить, что фумаратгидратаза обладает стереоспецифичностью, т.е. в ходе реакции образуется L-яблочная кислота:



Наконец, в ходе восьмой реакции цикла трикарбоновых кислот под влиянием митохондриальной NAD-зависимой малатдегидрогеназы происходит окисление L-малата в оксалоацетат:



Как видно, за один оборот цикла, состоящего из восьми ферментативных реакций, происходит полное окисление («сгорание») одной молекулы ацетил-СоА. Для непрерывной работы цикла необходимо постоянное поступление в систему ацетил-СоА, а коферменты (NAD⁺ и FAD), перешедшие в восстановленное состояние, должны снова и снова окисляться. Это окисление осуществляется в системе переносчиков электронов в дыхательной цепи (в цепи дыхательных ферментов), локализованной в мембране митохондрий. Образовавшийся FADH₂ прочно связан с сукцинатдегидрогеназа, поэтому он передает атомы водорода через СоQ.

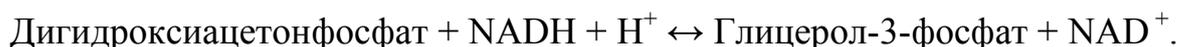
Освобождающаяся в результате окисления ацетил-СоА энергия в значительной мере сосредоточивается в макроэргических фосфатных связях АТФ. Из четырех пар атомов водорода три пары переносят NADH на систему транспорта электронов; при этом в расчете на каждую пару в системе биологического окисления образуется три молекулы АТФ (в процессе сопряженного окислительного фосфорилирования), а всего, следовательно, девять молекул АТФ. Одна пара атомов от сукцинатдегидрогеназы-FADH₂ попадает в

систему транспорта электронов через CoQ, в результате образуется только две молекулы АТФ. В ходе цикла Кребса синтезируется также одна молекула GTP (субстратное фосфорилирование), что равносильно одной молекуле АТФ. Итак, при окислении одной молекулы ацетил-СоА в цикле Кребса и системе окислительного фосфорилирования может образоваться двенадцать молекул АТФ.

Если подсчитать полный энергетический эффект гликолитического расщепления глюкозы и последующего окисления двух образовавшихся молекул пирувата до CO_2 и H_2O , то он окажется значительно большим.

Как отмечалось, одна молекула NADH (три молекулы АТФ) образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата в ацетил-СоА. При расщеплении одной молекулы глюкозы образуется две молекулы пирувата, а при окислении их до двух молекул ацетил-СоА и в ходе двух оборотов цикла трикарбоновых кислот синтезируется тридцать молекул АТФ (следовательно, окисление молекулы пирувата до CO_2 и H_2O дает пятнадцать молекул АТФ). К этому количеству надо добавить две молекулы АТФ, образующиеся при аэробном гликолизе, и шесть молекул АТФ, синтезирующихся за счет окисления двух молекул немитохондриального NADH, которые образуются при окислении двух молекул глицеральдегид-3-фосфата в дегидрогеназной реакции гликолиза. Следовательно, при расщеплении в тканях одной молекулы глюкозы по уравнению $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ синтезируется тридцать восемь молекул АТФ. Несомненно, что в энергетическом отношении полное расщепление глюкозы является более эффективным процессом, чем анаэробный гликолиз.

Необходимо отметить, что образовавшиеся в процессе превращения глицеральдегид-3-фосфата две молекулы NADH в дальнейшем при окислении могут давать не шесть молекул АТФ, а только четыре. Дело в том, что сами молекулы немитохондриального NADH не способны проникать через мембрану внутрь митохондрий. Однако отдаваемые ими электроны могут включаться в митохондриальную цепь биологического окисления с помощью так называемого глицеролфосфатного челночного механизма. Цитоплазматический NADH сначала реагирует с цитоплазматическим дигидроксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется NADH-зависимой цитоплазматической глицерол-3-фосфатдегидрогеназой:



Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная) глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (флавиновый фермент) снова окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата:



Восстановленный флавопротеин (фермент-FADH₂) вводит на уровне CoQ приобретенные им электроны в цепь биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму и может вновь взаимодействовать с цитоплазматическим NADH + H⁺.

Таким образом, пара электронов (из одной молекулы цитоплазматического NADH + H⁺), вводимая в дыхательную цепь с помощью глицеролфосфатного челночного механизма, дает не три, а две молекулы АТФ.

Лекция 19

Аэробный катаболизм углеводов (часть 2)

Регуляция цикла Кребса на уровне цитратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса

В большинстве случаев скорость функционирования метаболических циклов определяется их начальными реакциями. В ЦТК важнейшая регуляторная реакция – образование цитрата из оксалоацетата и ацетил-СоА, катализируемая *цитратсинтазой*. Эта реакция ускоряется при повышении концентрации оксалоацетата – субстрата реакции – и тормозится продуктом реакции – цитратом. Когда отношение NADH/NAD⁺ снижается, скорость окисления малата в оксалоацетат возрастает. Повышение концентрации оксалоацетата повышает цитратсинтазную реакцию. Скорость реакции снижается при повышении концентрации АТФ, сукцинил-СоА (сукцинил-СоА понижает сродство цитратсинтазы к ацетил-СоА) и длинноцепочечных жирных кислот (служат предшественниками ацетил-СоА). Однако точный механизм влияния этих метаболитов на цитратсинтазу недостаточно ясен ([рис. 19.1](#)).

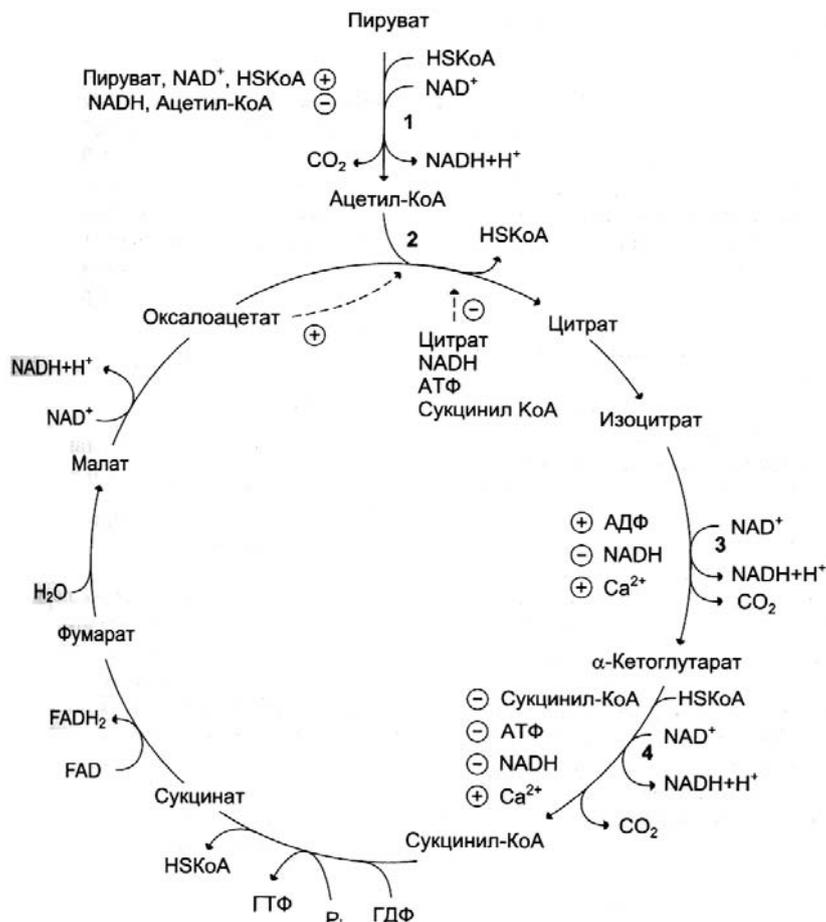


Рис. 19.1. Регуляция общего пути катаболизма: 1 – 4 – основные этапы

На первом этапе пируватдегидрогеназный комплекс активируется пируватом, NAD^+ , CoA ; ингибируется NADH и ацетил- CoA ; на втором этапе цитратсинтазная реакция ускоряется при повышении концентрации оксалоацетата и замедляется при повышении концентрации цитрата, NADH , ATP и сукцинил- CoA ; на третьем этапе изоцитратдегидрогеназа аллостерически активируется ADP , ионами кальция, ингибируется NADH ; на четвертом этапе α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс ингибируется NADH , ATP и сукцинил- CoA , активируется ионами кальция.

Изоцитратдегидрогеназа – олигомерный фермент, состоящий из 8 субъединиц. Присоединение изоцитрата к первой субъединице вызывает кооперативное изменение конформации других, увеличивая скорость присоединения субстрата. Фермент аллостерически активируется ADP и Ca^{2+} , которые присоединяются к нему в разных аллостерических центрах. В присутствии ADP конформация всех субъединиц меняется таким образом, что связывание изоцитрата происходит значительно быстрее. Таким образом, при концентрации изоцитрата, которая существует в митохондриальном матриксе, небольшие изменения концентрации ADP могут вызвать значительное изменение скорости реакции. Увеличение активности изоцитратдегидрогеназы снижает концентрацию цитрата, что в свою очередь уменьшает ингибирование цитратсинтазы продуктом реакции. При повышении концентрации NADH активность фермента снижается.

α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, имеющий сходное строение с пируватдегидрогеназным, в отличие от последнего не имеет в своём составе регуляторных субъединиц. Главный механизм регуляции *α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса* – ингибирование реакции NADH и сукцинил-СоА. *α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс*, как и изоцитратдегидрогеназа, активируется Ca^{2+} , а при повышении концентрации АТФ скорости обеих реакций снижаются.

Таким образом, в цикле лимонной кислоты регулируются, по меньшей мере, три стадии, и только в своих деталях эта регуляция у разных типов клеток несколько различается. Кроме описанных механизмов в регуляции цитратного цикла существует множество дополнительных механизмов, обеспечивающих необходимый уровень метаболитов и их участие в других метаболических путях.

Скорость гликолиза в нормальных условиях согласована со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты: в клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколько необходимо для того, чтобы обеспечить цикл лимонной кислоты «топливом», т. е. ацетильными группами ацетил-СоА. Ни пируват, ни лактат, ни ацетил-СоА обычно не накапливаются в аэробных клетках в больших количествах; их концентрации поддерживаются на некоем постоянном уровне, соответствующем динамическому равновесию. Согласованность между скоростью гликолиза и скоростью функционирования цикла лимонной кислоты объясняется не только тем, что первый процесс ингибируется высокими концентрациями АТФ и NADH, т. е. компонентами, общими для гликолитической и дыхательной стадий окисления глюкозы; определенную роль в этой согласованности играет также и концентрация цитрата. Продукт первой стадии цикла лимонной кислоты – цитрат – является аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы, катализирующей в процессе гликолиза реакцию фосфорилирования фруктозо-6-фосфата.

Амфиболическое значение цикла Кребса.

Необходимость анаэробных путей, пополняющих запас компонентов, участвующих в цикле

Цикл лимонной кислоты □ это один из амфиболических путей. Он используется не только для окислительного катаболизма, т. е. расщепления углеводов, жирных кислот и аминокислот, но может служить также первой стадией многих биосинтетических путей, для которых он является источником молекул-предшественников ([рис. 19.2](#)).

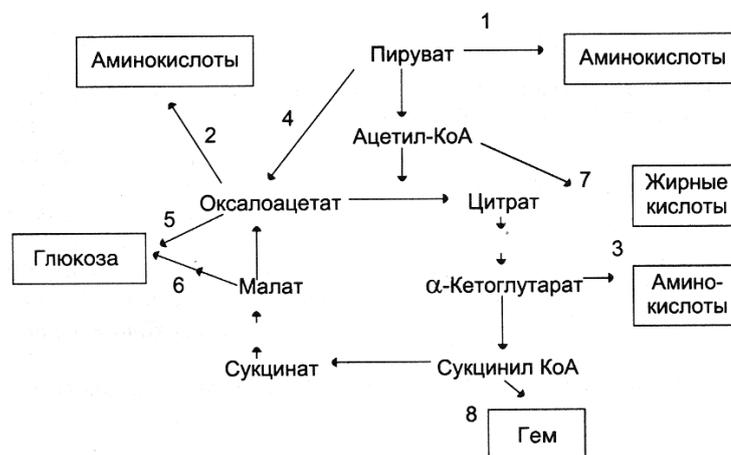


Рис. 19.2. Использование метаболитов ЦТК в синтезе различных соединений: 1 – 3 – синтез заменимых аминокислот; 4 – 6 синтез глюкозы; 7 – синтез жирных кислот; 8 – синтез гема

Под воздействием ряда важных вспомогательных ферментов некоторые промежуточные продукты цикла лимонной кислоты, главным образом α -кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат, могут удаляться из цикла и использоваться в качестве молекул-предшественников аминокислот. Скорость функционирования цикла лимонной кислоты при этом, казалось бы, должна снижаться, поскольку такой отток промежуточных продуктов из цикла должен понижать их концентрацию в клетке. В действительности же этого не происходит, т. к. убыль промежуточных продуктов цикла восполняется благодаря действию другого набора ферментов (анаплеротические реакции), (см. [рис. 19.2](#), [рис. 19.3](#); [табл. 19.1](#)).

Анаплеротические (пополняющие) реакции – специальные ферментативные реакции, обеспечивающие пополнение пула промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты.

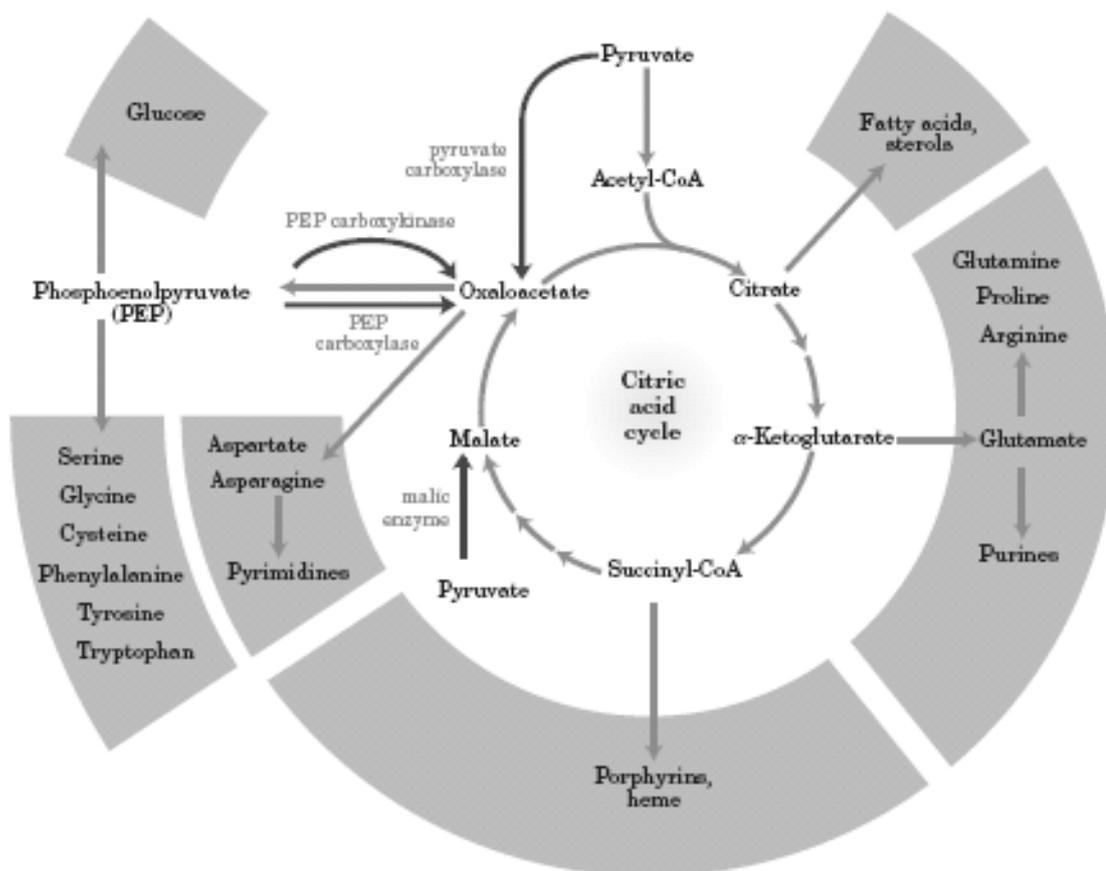


Рис. 19.3. Роль интермедиатов цикла лимонной кислоты в анаболизме

Таблица 19.1

Анаплеротические реакции

Реакция	Ткань/организм
$\text{Пируват} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Печень, почки
$\text{Фосфоенолпируват} + \text{CO}_2 + \text{GDF} \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{GTP}$	Сердце, скелетная мускулатура
$\text{Фосфоенолпируват} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{P}_i$	Высшие растения, дрожжи, бактерии
$\text{Пируват} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{Малат} + \text{NAD(P)}^+$	Широко распространена у эукариот и прокариот

При нормальных условиях реакции, отвлекающие промежуточные продукты из цикла, и реакции, восполняющие их убыль, находятся в состоянии динамического равновесия, так что концентрация этих продуктов в митохондриях остается более или менее постоянной.

Зависимое от АТФ и биотина карбоксилирование пирувата: анаплеротический путь синтеза оксалоацетата

Наиболее важная анаплеротическая реакция в животных тканях – это ферментативное карбоксилирование пирувата за счет CO_2 с образованием оксалоацетата (рис. 19.4); катализирует эту обратимую реакцию фермент пируваткарбоксилаза:

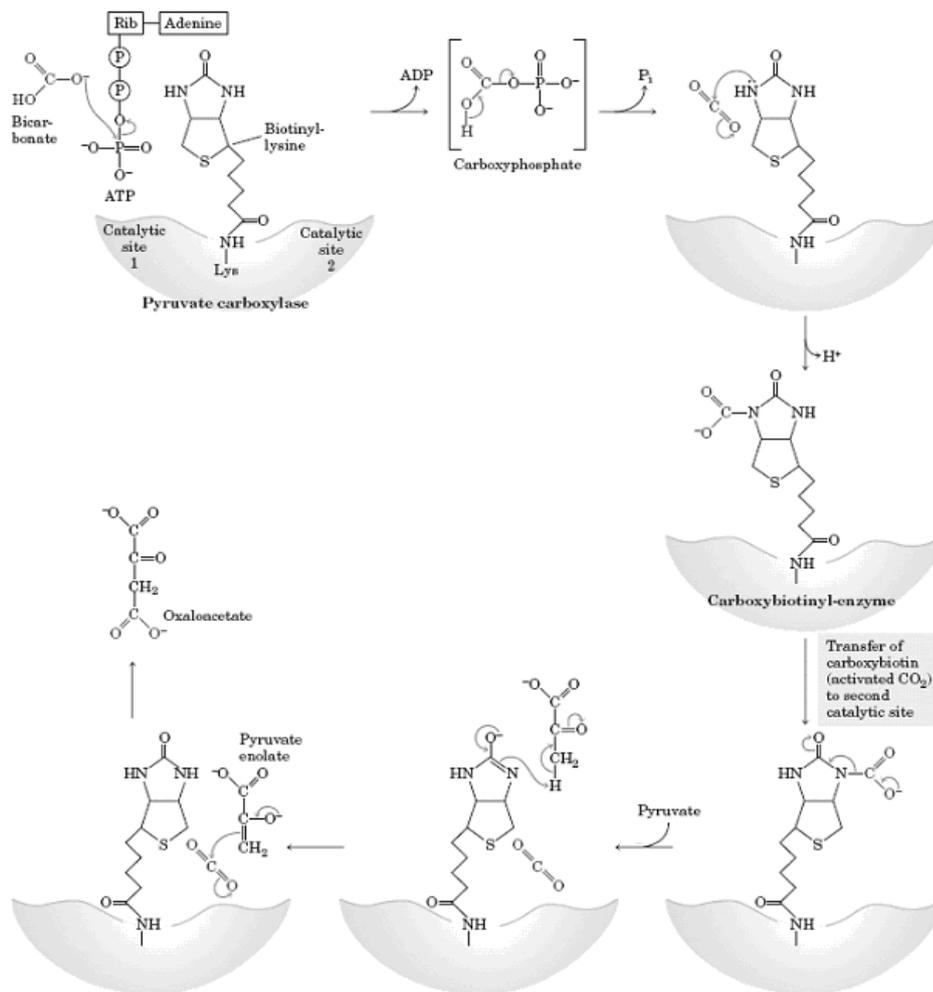
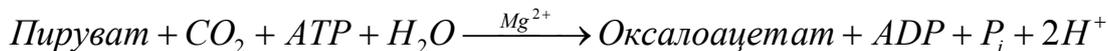


Рис. 19.4. Пируваткарбоксилазная реакция

На рис. 19.4 видно, что карбоксильная группа биотина образует пептидную связь с ϵ -аминогруппой остатка лизина, входящего в состав активного центра фермента. CO_2 активируется, образуя N-карбосипроизводное биотинильной простетической группы. Затем эта карбоксильная группа – непосредственный донор CO_2 для пирувата – переносится на пируват.

Если для цикла лимонной кислоты не хватает оксалоацетата или какого-нибудь другого промежуточного продукта цикла, то карбоксилирование пирувата стимулируется и запас оксалоацетата растет. Для ферментативного присоединения карбоксильной группы к молекуле пирувата требуется энергия. Её источником служит сопряженное с данной реакцией расщепление

АТФ до АДФ и фосфата. Поскольку суммарная реакция сопровождается лишь незначительным изменением стандартной свободной энергии, мы можем заключить, что свободная энергия, необходимая для присоединения карбоксильной группы к пирувату, примерно равна свободной энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ.

Пируваткарбоксилаза – очень сложный фермент. Его молекулярная масса равна приблизительно 650 кДа. Молекула фермента содержит четыре простетические группы. Каждая из них состоит из одной молекулы витамина *биотина*, ковалентно связанного пептидной связью с ε-аминогруппой особого остатка лизина, находящегося в активном центре (рис. 19.4). Свободный CO₂, предшественник новой карбоксильной группы оксалоацетата, сначала активируется путём присоединения к одному из атомов азота в молекуле биотина. Эта активация, связанная с расходом АТФ, составляет первую стадию реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой:



На второй стадии, протекающей также в активном центре фермента, активированная карбоксильная группа, ковалентно связанная с простетической группой фермента, переносится на пируват с образованием оксалоацетата (рис. 19.4):



Пируваткарбоксилаза принадлежит к регуляторным ферментам. В отсутствие ацетил-СоА, который служит для нее положительным модулятором, скорость катализируемой ею прямой реакции, приводящей к образованию оксалоацетата, очень невелика (рис. 19.5). Избыток же ацетил-СоА, поставляющего «топливо» для цикла лимонной кислоты, стимулирует пируваткарбоксилазную реакцию; в результате этого образуется больше оксалоацетата и цикл использует больше ацетил-СоА в цитратсинтазной реакции.

Пируваткарбоксилазная реакция □ главная анаэробная реакция в печени и почках. В миокарде и в мышцах протекают другие анаэробные реакции. Одна из таких реакций катализируется фосфоенолпируваткарбоксикиназой.



В этой реакции происходит расщепление фосфоенолпирувата – сверхвысокоэнергетического фосфорилированного соединения, образующегося в процессе гликолиза. Высвобождаемая энергия используется для карбоксилирования с образованием оксалоацетата, а ее остаток запасается в форме GTP.

Пентозофосфатный путь (гексозомонофосфатный шунт)

Пентозофосфатный путь (ПФП), называемый также гексомонофосфатным шунтом, служит альтернативным путём окисления глюкозо-6-фосфата.

Пентозофосфатный цикл начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и последующего окислительного декарбоксилирования продукта (в результате от гексозофосфата отщепляется первый атом углерода). Это первая, так называемая окислительная, стадия пентозофосфатного цикла. Вторая стадия включает неокислительные превращения пентозофосфатов с образованием исходного глюкозо-6-фосфата (рис. 19.5).

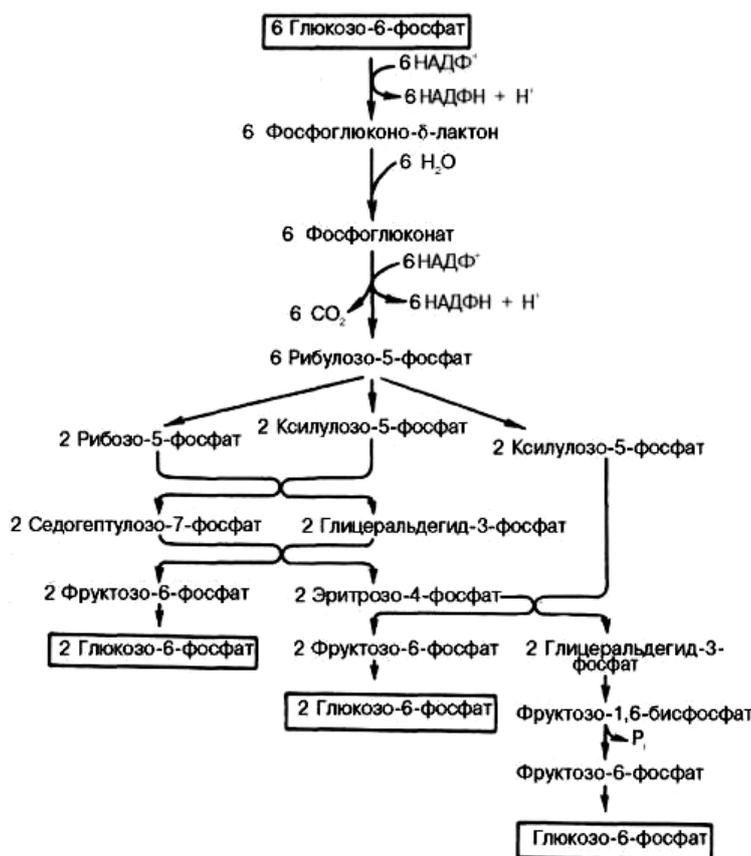


Рис. 19.5. Пентозофосфатный путь окисления углеводов

В норме доля ПФП в количественном превращении глюкозы обычно невелика, варьируется у разных организмов и зависит от типа ткани и ее функционального состояния.

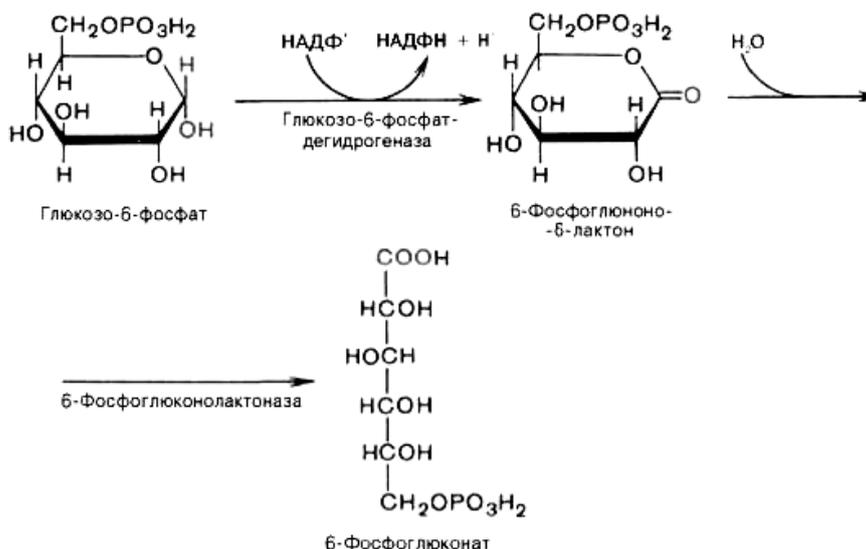
У млекопитающих активность ПФП относительно высока в печени, надпочечниках, эритроцитах, эмбриональной ткани и молочной железе в период лактации. Реакции пентозофосфатного цикла протекают в цитозоле клетки. Значение ПФП в обмене веществ велико. Он поставляет восстановленный NADPH, необходимый для биосинтеза жирных кислот, холестерина и т.д. За счет пентозофосфатного цикла примерно на 50% покрывается потребность организма в NADPH.

Другая функция пентозофосфатного цикла заключается в том, что он

поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и многих коферментов. При ряде патологических состояний удельный вес пентозофосфатного пути окисления глюкозы возрастает. Механизм реакций пентозофосфатного цикла достаточно расшифрован.

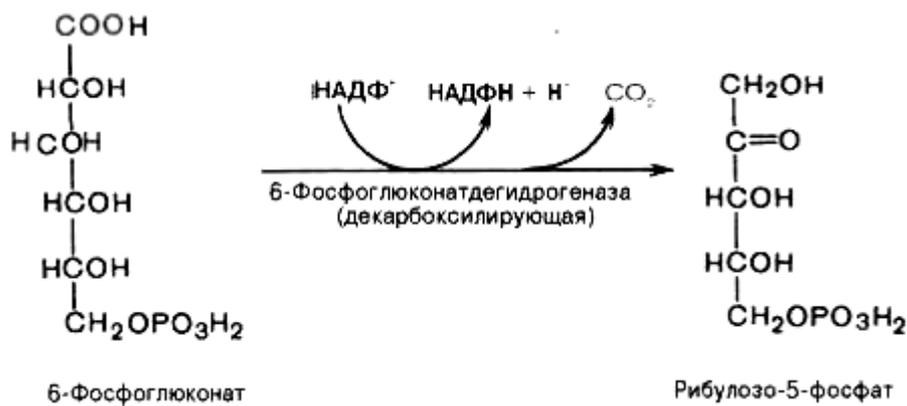
**Отдельные реакции ПФП, их термодинамические характеристики.
Суммарное уравнение пентозофосфатного пути. Регуляция пентозофосфатного пути на уровне глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы**

Первая реакция – дегидрирование глюкозо-6-фосфата при участии фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и кофермента $NADP^+$. Образовавшийся в ходе реакции 6-фосфоглюконо- δ -лактон – соединение нестабильное и с большой скоростью гидролизуется либо спонтанно, либо с помощью фермента 6-D-фосфоглюконолактоназы с образованием 6-фосфоглюконовой кислоты (6-фосфоглюконат):

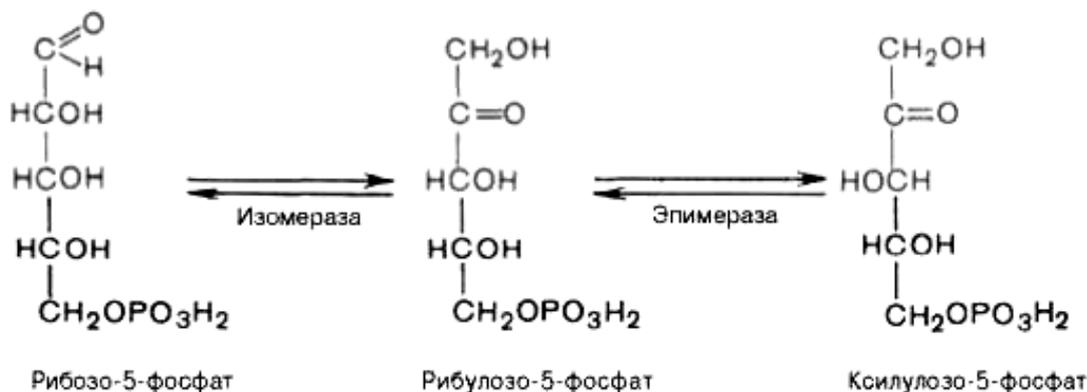


Г6ФДГ представляет собой димер с молекулярной массой 104-110 кДа, состоящий из двух идентичных субъединиц. Установлено, что лизин-169 является функциональным центром фермента, влияющим на каталитическую активность Г6ФДГ. Показано, что $NADP^+$ способствует стабилизации Г6ФДГ и сохранению её в активном состоянии, а $NADPH$ – продукт реакции, является сильным ингибитором Г6ФДГ, вызывающим диссоциацию белковой молекулы. Кроме того, ингибировать активность Г6ФДГ могут АТФ и 2,3-бисфосфоглицерат (в меньшей степени). Г6ФДГ локализована в цитозоле и на внутренней поверхности плазматической мембраны.

Во второй окислительной реакции, катализируемой 6-фосфоглюконат-дегидрогеназой (декарбоксилирующей), 6-фосфоглюконат дегидрируется и декарбоксилируется. В результате образуется фосфорилированная кетопентоза □ D-рибулозо-5-фосфат и еще 1 молекула $NADPH$:

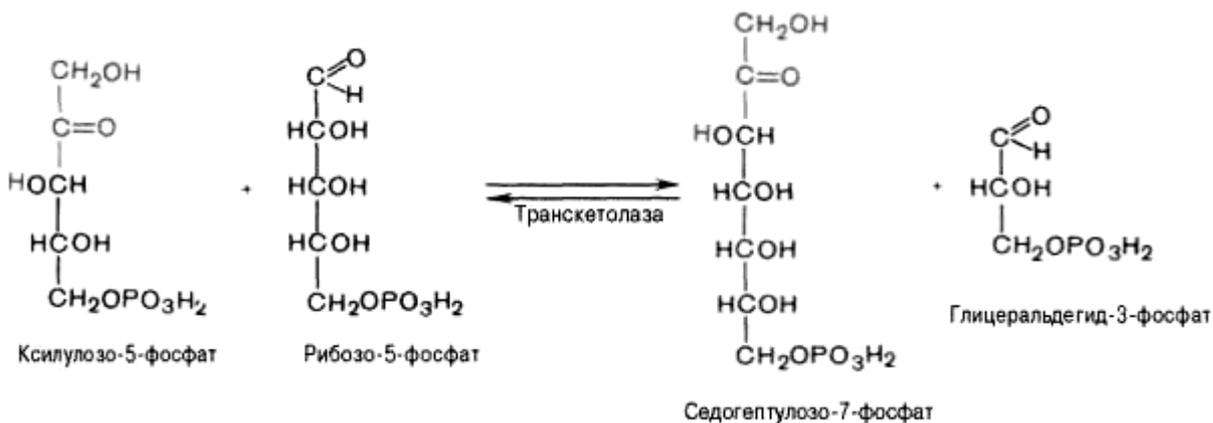


Под действием соответствующей эпимеразы из рибулозо-5-фосфата может образоваться другая фосфопентоза □ ксилулозо-5-фосфат. Кроме того, рибулозо-5-фосфат под влиянием особой изомеразы легко превращается в рибозо-5-фосфат. Между этими формами пентозофосфатов устанавливается состояние подвижного равновесия:



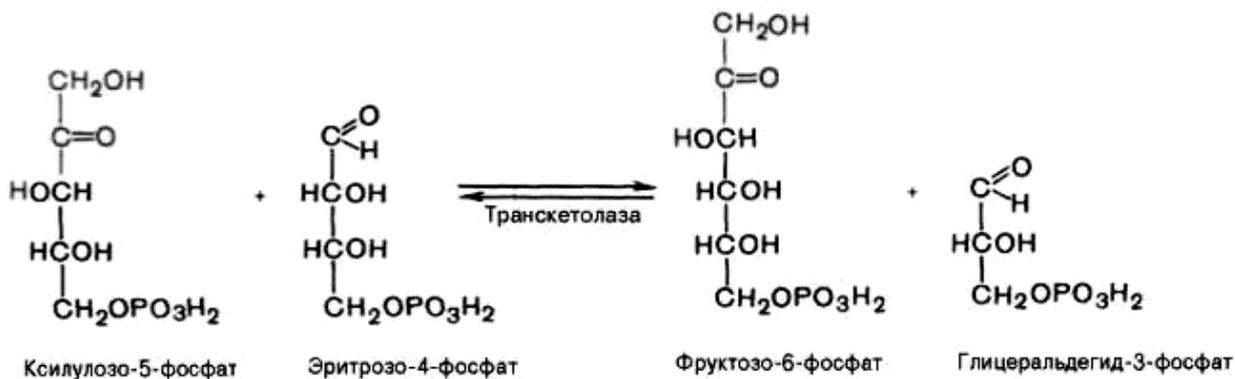
При определенных условиях пентозофосфатный путь на этом этапе может быть завершен. Однако при других условиях наступает так называемый неокислительный этап пентозофосфатного цикла. Реакции этого этапа не связаны с использованием кислорода и протекают в анаэробных условиях. При этом частично образуются вещества, характерные для первой стадии гликолиза (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, фосфотриозы), а частично – специфические для пентозофосфатного пути (седогептулозо-7-фосфат, пентозо-5-фосфаты, эритрозо-4-фосфат).

Основными реакциями неокислительной стадии пентозофосфатного цикла являются транскетолазная и трансальдолазная. Эти реакции катализируют превращение изомерных пентозо-5-фосфатов:

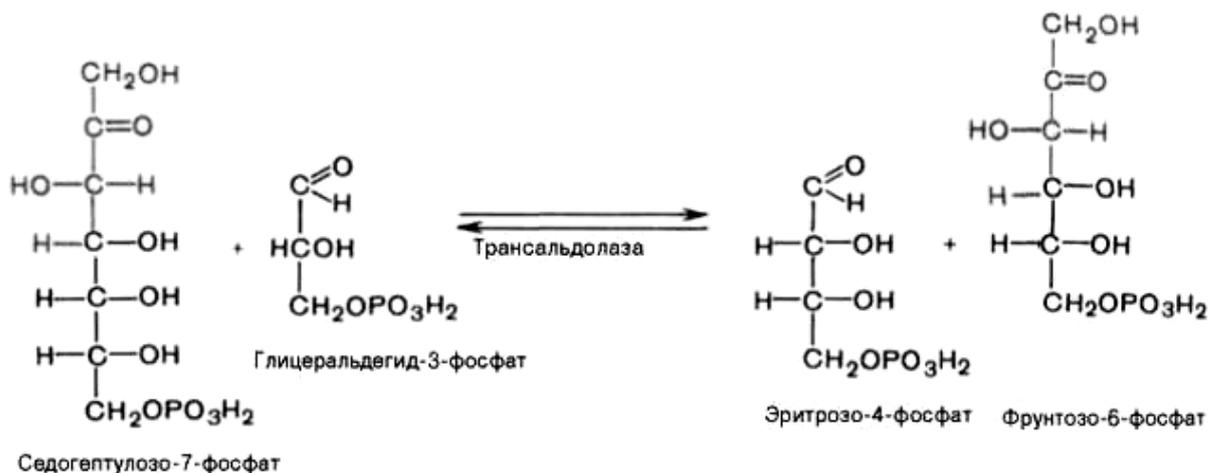


Коферментом в транскетолазной реакции служит тиаминпирофосфат, играющий роль промежуточного переносчика гликольальдегидной группы от ксилулозо-5-фосфата к рибозо-5-фосфату. В результате образуется семиуглеродный моносахарид седогептулозо-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат.

Транскетолазная реакция в пентозном цикле встречается дважды (второй раз – при образовании фруктозо-6-фосфата и триозофосфата в результате взаимодействия второй молекулы ксилулозо-5-фосфата с эритрозо-4-фосфатом):

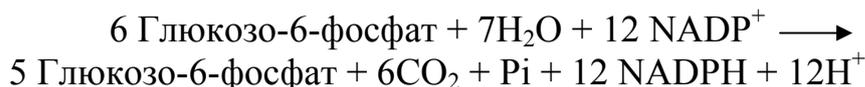


Фермент трансальдолаза катализирует перенос остатка диоксиацетона (но не свободного диоксиацетона) от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат:



Шесть молекул глюкозо-6-фосфата, вступая в пентозофосфатный цикл, образуют 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6 молекул CO₂, после чего из шести молекул рибулозо-5-фосфата снова регенерируется пять молекул глюкозо-6-фосфата ([рис.19.5](#)). Однако это не означает того, что молекула глюкозо-6-фосфата, вступающая в цикл, полностью окисляется. Все 6 молекул CO₂ образуются из C-1-атомов шести молекул глюкозо-6-фосфата.

Валовое уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного цикла можно представить в следующем виде:



или



Образовавшийся NADPH используется в цитозоле на восстановительные синтезы и, как правило, не участвует в окислительном фосфорилировании, протекающем в митохондриях.

Участки перекреста ПФП с гликолизом

В последние годы появились работы, которые дают основание предполагать, что в некоторых тканях схема пентозофосфатного превращения углеводов сложнее, чем это представлено на [рис. 19.5](#). Согласно этой более полной схеме пентозофосфатного пути первые этапы превращения совпадают с прежней схемой, однако после первой транскетолазной реакции начинаются некоторые отклонения ([рис. 19.6](#)).

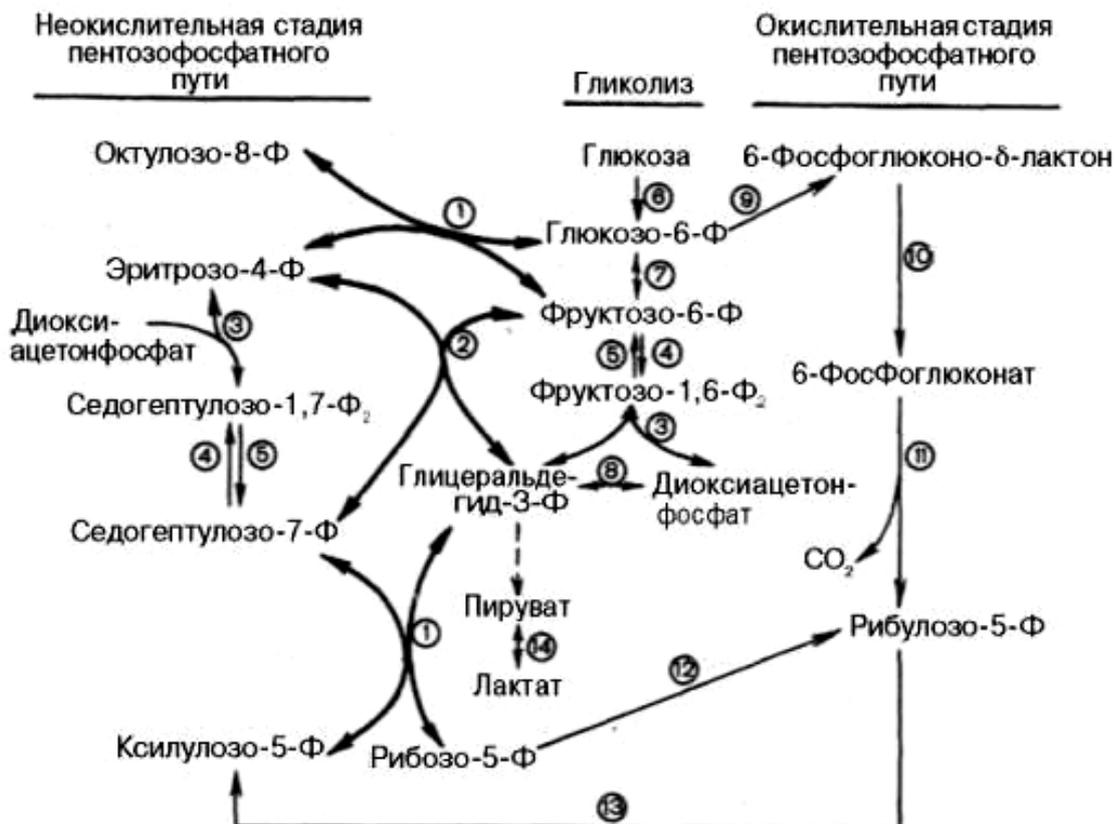


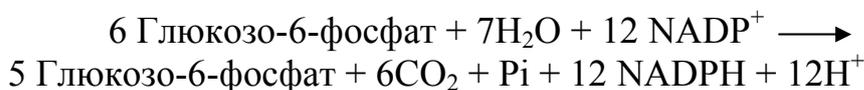
Рис. 19.6. Современная схема пентозофосфатного пути окисления углеводов

Согласно этой схеме, ПФП и гликолиз, протекающие в цитозоле, взаимосвязаны и способны переключаться друг на друга в зависимости от соотношения концентраций промежуточных продуктов, образовавшихся в клетке.

Циклический характер ПФП

Окислительный этап образования пентоз и неокислительный этап (путь возвращения пентоз в гексозы) вместе составляют циклический процесс.

Вернёмся к суммарному уравнению ПФП:



Это означает, что из шести молекул глюкозы образуется шесть молекул рибулозо-5-фосфат (пентозы) и шесть молекул CO_2 . Ферменты неокислительной фазы превращают 6 молекул рибулозо-5-фосфат в 5 молекул глюкозы (гексозы). При последовательном проведении этих реакций единственным полезным продуктом является NADPH, образующийся в окислительной фазе пентозофосфатного пути. Такой процесс называют *пентозофосфатным циклом* (рис. 19.7)

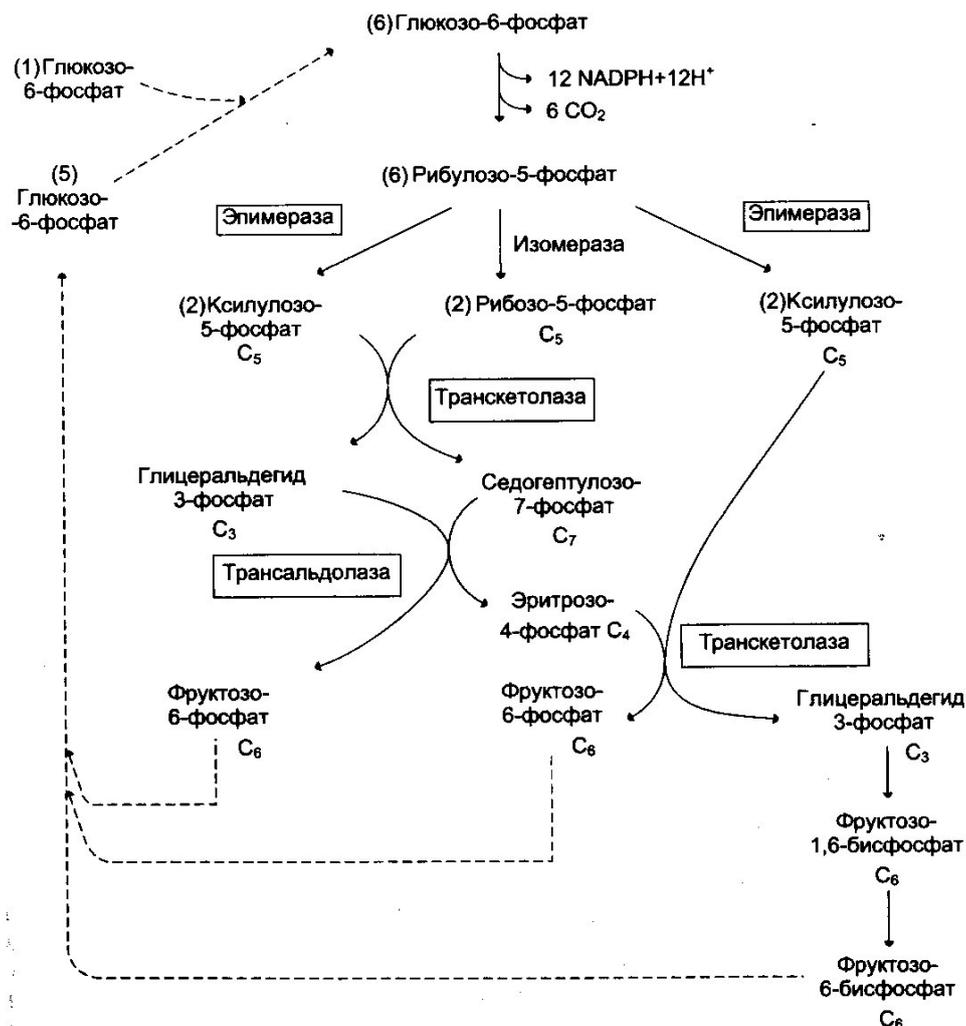


Рис. 19.7. Пентозофосфатный цикл в жировой ткани

Протекание пентозофосфатного цикла позволяет клеткам продуцировать NADPH, необходимый для синтеза жиров, не накапливая пентозы.

Энергия, выделяющаяся при распаде глюкозы, трансформируется в энергию высокоэнергетического донора водорода – NADPH. Гидрированный NADPH служит источником водорода для восстановительного синтеза, а энергия NADPH преобразуется и сохраняется во вновь синтезированных веществах, например в жирных кислотах, высвобождается при их катаболизме и используется клетками.

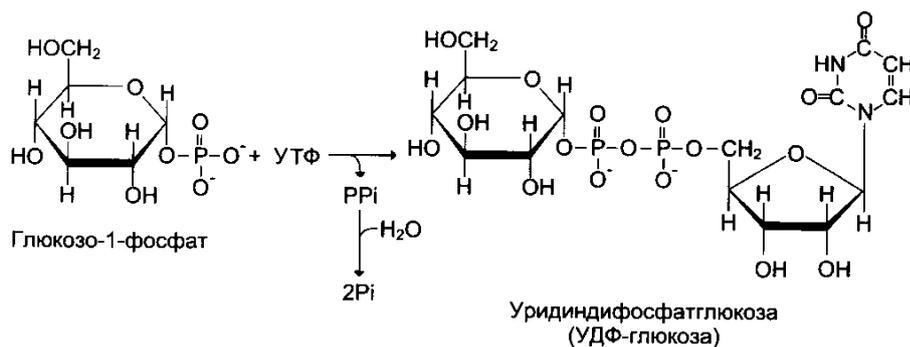
Лекция 20 Биосинтез углеводов

Гликоген является запасной формой углеводов в организме животных, синтезируется главным образом в печени и составляет до 6% от её массы. В скелетных мышцах его масса не превышает 1%. Как и любой анаболический процесс, синтез гликогена является эндогенным.

Синтез гликогена начинается с затраты молекулы АТФ для фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. Фосфорилирование свободной глюкозы в мышцах идет при участии фермента гексокиназы, а в печени – глюкокиназы.



Следующая реакция изомеризации глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат катализируется ферментом фосфоглюкомутазой. Именно в таком виде глюкоза вовлекается в дальнейший синтез гликогена.



Образование UDP-глюкозы

Однако в силу обратимости фосфоглюкомутазной реакции и чтобы синтез гликогена был термодинамически необратим, необходима дополнительная стадия образования уридиндифосфатглюкозы из UDP и глюкозо-1-фосфата под контролем фермента UDP-глюкопирофосфорилазы. Реакция сдвинута вправо, так как образовавшийся в ходе реакции пирофосфат очень быстро расщепляется пирофосфатазой на две молекулы фосфата.

Образование UDP-глюкозы обеспечивает невозможность протекания распада гликогена путем обратных реакций синтеза этого гомополисахарида.

В клетках гликоген никогда не расщепляется полностью и поэтому перенос глюкозидного остатка, входящего в состав UDP-глюкозы идет на гликозидную затравку (праймер) гликогена. В результате образуется α -(1,4)-гликозидная связь между первым атомом углерода, добавляемого остатка глюкозы и 4-гидроксильной группой остатка глюкозы в молекуле гликогена, реакция катализируется ферментом гликогенсинтазой. Донором глюкозид-

ных групп при синтезе крахмала у растений является не UDP-глюкоза, а ADP-D-глюкоза.

Глюкозидные остатки переносятся гликогенсинтазой на нередуцирующий конец олигосахарида. Образование α -1,6-связей происходит в точке ветвления по одной на каждые 8-12 остатков глюкозы, соединенных α -1,4 – связями, при участии амило-1,4-1,6-глюкозилтрансферазы. Этот фермент отщепляет фрагмент из 6-7 остатков линейного участка цепи 1,4-гликана и переносит его на ту же самую или другую цепь, но в положение 6 с образованием α -1,6-гликозидной связи. Новая точка ветвления может формироваться не менее чем через четыре остатка от любой уже существующей. По мере синтеза гликогена число ветвлений многократно возрастает. Гликоген хранится в клетке в форме гранул диаметром 10-40 нм.

Процесс синтеза гликогена и его распада контролируется и согласуется с потребностями организма в глюкозе как источнике энергии. Одновременное протекание этих процессов невозможно, т. к. в этом случае образуется «холостой» цикл, приводящий к бесполезной трате АТФ. Переключение процессов синтеза и распада гликогена происходит при смене состояния покоя (абсорбтивный период) на активный режим (постабсорбтивный). В печени переключение этих метаболических путей находится под контролем гормонов поджелудочной железы – инсулина и глюкагона и гормона, вырабатываемого клетками мозгового вещества надпочечников – адреналина, в мышцах \square инсулином и адреналином, в мозге – адреналином.

Регуляторным ферментом синтеза гликогена является гликогенсинтаза, которая находится в двух формах, т.е. неактивной (β -форма) и активной (α -форма). Причем она регулируется прямо противоположно (реципроктно) по отношению к гликогенфосфорилазе, то есть дефосфорилированная гликогенсинтаза активна, а фосфорилированная \square неактивна. Известна также аллостерическая регуляция активности гликогенсинтазы- β высокими концентрациями глюкозо-6-фосфата, что приводит к повышению активности гликогенсинтазы. В переводе гликогенсинтезы из неактивной формы в активную участвует фосфопротеинфосфатаза.

Глюконеогенез

Глюконеогенез – процесс синтеза глюкозы de novo из неуглеродных предшественников. Главная функция этого процесса заключается в поддержании уровня глюкозы в крови во время голодания и интенсивной физической работы. Наиболее активно процесс протекает в печени, менее интенсивно в корковом слое почек и слизистом эпителии кишечника. Недостаток глюкозы в крови, прежде всего, ощущает головной мозг, который не может удовлетворить потребность в энергии за счет метаболизма других энергоёмких веществ.

Большинство реакций глюконеогенеза протекает за счет обратимых реакций гликолиза и катализируется теми же ферментами. Однако образование

фосфоенолпирувата, гидролиз фруктозо-1,6-бисфосфата и глюкозо-6-фосфата термодинамически необратимы и протекают другими путями.

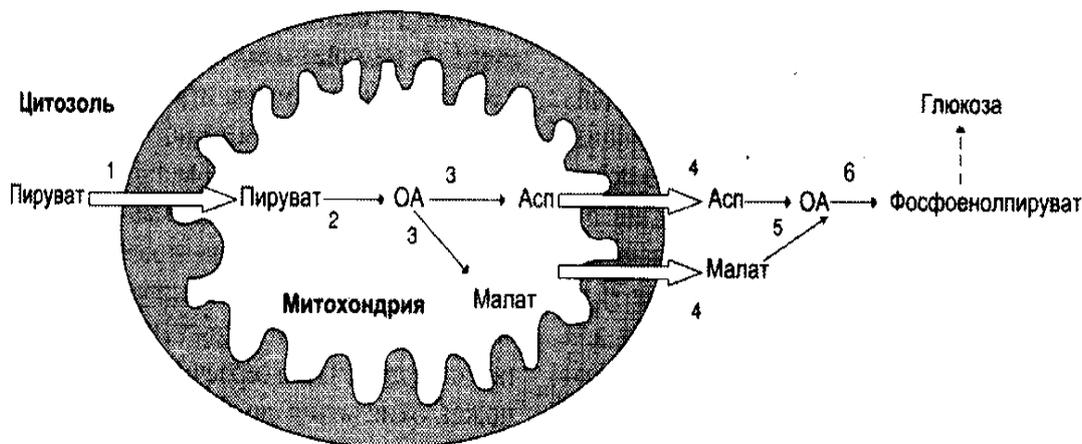
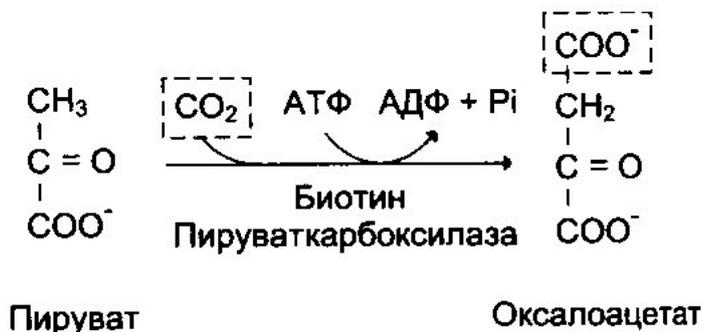


Рис. 20.1. Образование оксалоацетата, транспорт в цитозоль и превращение в фосфоенолпируват. 1 – транспорт пирувата из цитозоля в митохондрию; 2 – превращение пирувата в оксалоацетат (ОА); 3 – превращение ОА в малат или аспартат; 4 – транспорт аспартата и малата из митохондрии в цитозоль; 5 – превращение аспартата в ОА; 6 – превращение ОА в фосфоенолпируват.

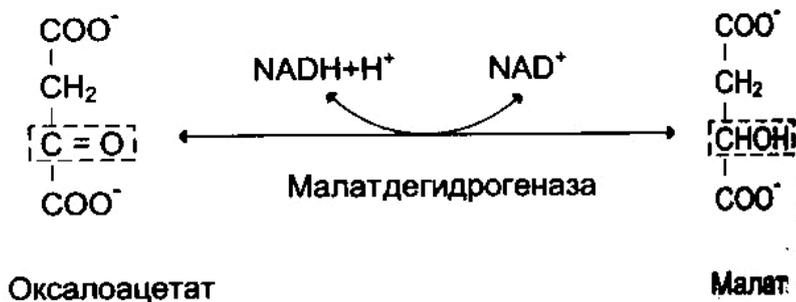
Образование фосфоенолпирувата из пирувата происходит в ходе двух реакций: пируват из цитозоля переносится в митохондрии и там карбоксилируется с образованием оксалоацетата.

Митохондриальный фермент пируваткарбоксилаза, катализирующий данное превращение пирувата, в качестве кофермента содержит биотин. Реакция протекает с затратой молекулы АТФ (детали реакции см. [рис. 19.4](#), лекция 19).

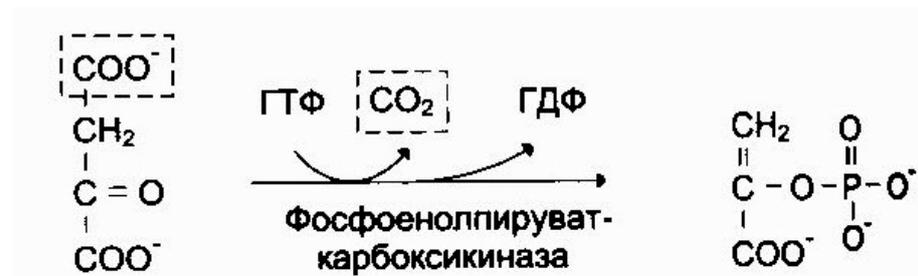


Для оксалоацетата внутренняя мембрана митохондрий непроницаема, транспорт оксалоацетата в цитоплазму клетки происходит с помощью малатного челночного механизма, смысл которого заключается в восстановлении оксалоацетата до малата под действием митохондриального фермента малатдегидрогеназы.

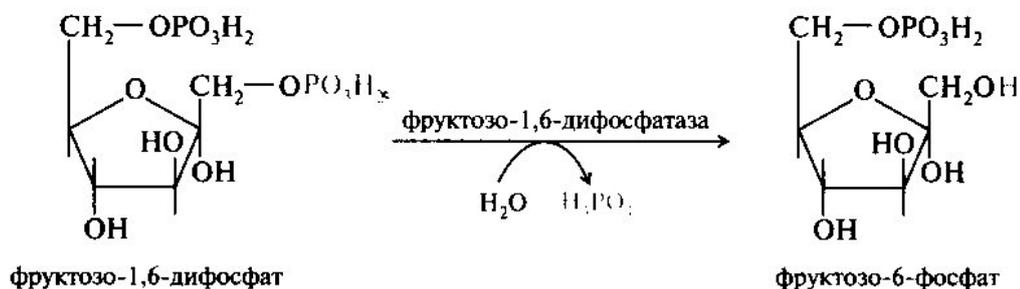
Малат выходит в цитоплазму, где цитоплазматическая малатдегидрогеназа окисляет малат до оксалоацетата. Митохондриальная малатдегидрогеназа NADH-зависимая, а цитозольная в качестве кофермента содержит NAD^+



В последующей реакции, катализируемой ферментом фосфоенолпируваткарбоксикиназой, из оксалоацетата образуется фосфоенолпируват. Реакция Mg^{2+} -зависимая и донором фосфата служит GTP.



После образования фосфоенолпирувата процесс глюконеогенеза идет по обратимым реакциям гликолиза, вплоть до синтеза фруктозо-1,6-бисфосфата. Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат – необратимая реакция глюконеогенеза, а потому отщепление фосфатной группы катализируется фруктозо-1,6-фосфатазой:



Данная реакция протекает без участия ATP и ADP.



Образовавшийся фруктозо-6-фосфат фосфоглюкоизомеразой переводится в глюкозо-6-фосфат, который под действием глюкозо-6-фосфатазы (в процессе гликолиза этот фермент не участвует, и это еще одна необратимая реакция глюконеогенеза) теряет фосфатную группу и превращается в свободную глюкозу. После чего глюкоза транспортируется в кровь.

Суммарный результат глюконеогенеза из пирувата выражается следующим уравнением:



Регуляторным ферментом в глюконеогенезе является пируваткарбоксилаза, которая активируется ацетил-СоА тогда, когда в митохондриях накапливается больше данного субстрата, чем требуется для протекания цикла трикарбоновых кислот.

Одновременно ацетил-СоА ингибирует пируватдегидрогеназный комплекс, что приводит к замедлению окисления пирувата и способствует вовлечению его в глюконеогенез.

Немаловажную роль в регуляции глюконеогенеза играет фруктозо-1,6-бисфосфатаза, ингибируемая АМР. При высоком соотношении АТР/АМР активируется глюконеогенез и ингибируется гликолиз, т. к. АТР является ингибитором лимитирующего фермента гликолиза – фосфофруктокиназы.

В последнее время установлено, что наиболее мощным аллостерическим регулятором является фруктозо-2,6-бисфосфат. Это бисфосфорное производное фруктозы ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу и активирует фосфофруктокиназу.

Синтез глюкозы из лактата и превращение его в пируват есть способ утилизации лактата, который накапливается в интенсивно сокращающихся мышцах или клетках с преобладанием анаэробного катаболизма глюкозы.

Лактат из мышц поступает в кровь, затем – в печень. В печени соотношение NADH/NAD^+ ниже, чем в работающей мышце, поэтому лактатдегидрогеназа работает в направлении образования пирувата, включающегося в глюконеогенез. Образовавшаяся глюкоза из печени поступает в кровь и затем в мышцу.

Вышеизложенная последовательность событий называется «глюкозо-лактатным циклом», или «циклом Кори», выполняющим функции утилизации лактата и предотвращения лактоацидозов

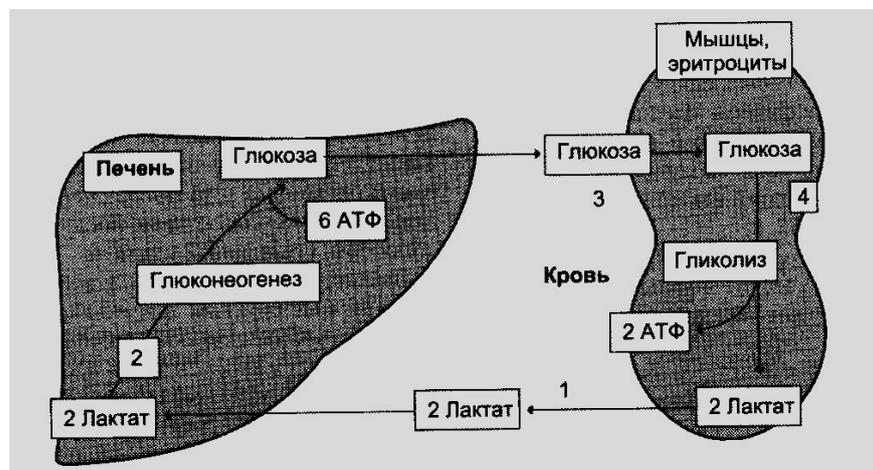


Рис. 20.2. Цикл Кори (глюкоза-лактатный цикл): 1 □ поступление лактата из сокращающейся мышцы с током крови в печень; 2 – синтез глюкозы из лактата в печени; 3 – поступление глюкозы из печени с током крови в работающую мышцу; 4 – использование глюкозы как энергетического субстрата сокращающейся мышцей и образование лактата

Термин «лактоацидоз» обозначает увеличение кислотности среды организма до значений, выходящих за пределы нормы. При ацидозе либо увеличивается продукция протонов или происходит снижение их экскреции. А в некоторых случаях и то и другое.

Лекция 21

Расщепление пищевых и тканевых липидов

Пищевые липиды являются источниками высших жирных кислот, глицерола, аминок спиртов и некоторых других соединений, используемых организмом для синтеза свойственных для него структурных или резервных липидов. Свободные жирные кислоты, наряду с глицеролом и аминок спиртами образуются в организме также при расщеплении резервных или структурных липидов. Еще одним источником высших жирных кислот может служить их синтез из ацетил-СоА, который в свою очередь может быть промежуточным продуктом обмена углеводов или аминокислот (рис.21.1).

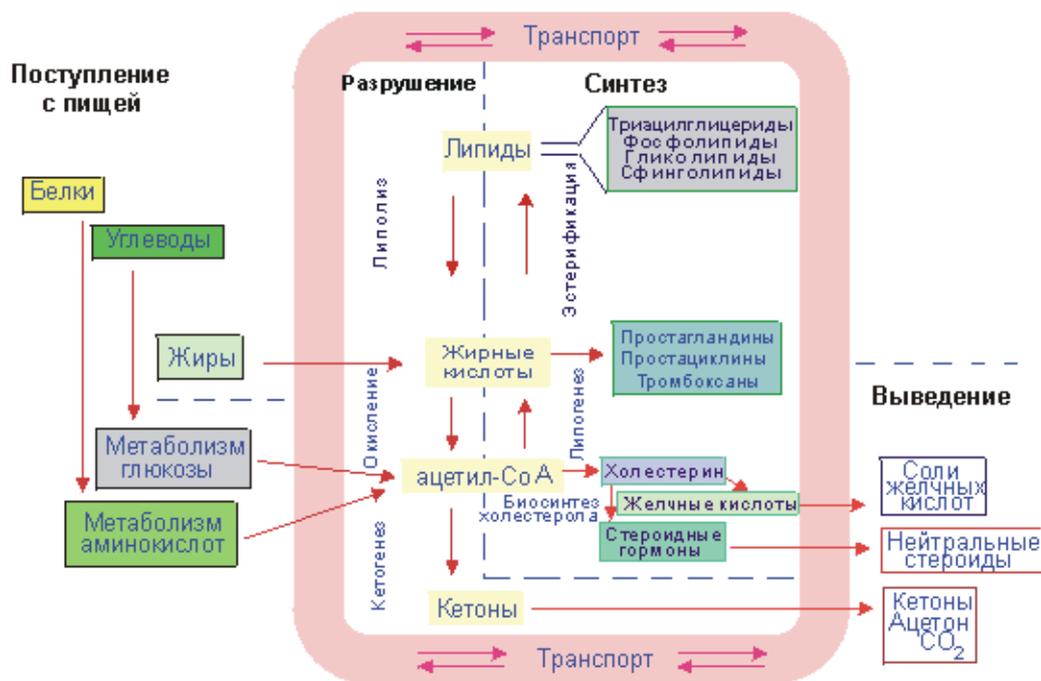


Рис. 21.1. Схема ключевых процессов липидного обмена

Одним из ключевых метаболитов липидного обмена является ацетил-СоА, поскольку, во-первых, именно через это соединение осуществляется окислительное расщепление высших жирных кислот; во-вторых, через ацетил-СоА атомы углерода жирных кислот могут быть использованы для пластических целей – для синтеза холестерина или полипреноидов; в третьих, через ацетил-СоА в гепатоцитах углеродные цепи жирных кислот преобразуются в кетоновые тела – гидрофильные «топливные» молекулы, легко транспортируемые в клетки различных органов и тканей; в четвертых, через ацетил-СоА осуществляются метаболические превращения углеродных скелетов аминокислот и моносахаридов в жирные кислоты (ЖК), используемые в дальнейшем для синтеза сложных липидов.

Соединения других классов – аминокислоты и моносахариды – в ходе своего метаболизма образуют промежуточные продукты, которые могут в дальнейшем использоваться в клетке как для синтеза высших жирных кислот, так и для образования других мономерных единиц, необходимых для синтеза сложных липидов: глицерола, этаноламина, холина, сфингозина и пр. Таким образом, обмен липидов оказывается тесно связанным с обменом соединений других классов, а метаболические пути обмена липидов различных классов являются частью метаболической сети, функционирующей в организме.

С пищей в организм человека ежедневно поступает от 80 до 150 г липидов животного и растительного происхождения. В составе липидов в организм поступают полиеновые жирных кислот, которые не синтезируются в организме. Кроме того, с липидами в организм поступают и жирорастворимые витамины – А, D, E и К. Основная масса липидов представлена жирами или триацилглицеролами. Они, наряду с глюкозой служат главными источ-

никами энергии. На долю жиров при рациональном питании приходится не более 30% от общего числа калорий, поступающих с пищей. В пожилом возрасте, а также при малой физической нагрузке потребность в жирах снижается; в условиях физической работы – увеличивается.

Катаболизм липидов

В расщеплении простых и сложных липидов принимают участие липолитические ферменты, относящиеся к классу гидролаз, а сам процесс расщепления липидов носит название липолиза. В организме животных до 90% липидов, поступающих с пищей, приходится на долю жиров. Переваривание жиров происходит в тонком кишечнике. Предварительно нерастворимые в воде жиры эмульгируются. Эмульгирование происходит под действием солей желчных кислот, которые попадают с желчью в просвет 12-перстной кишки. Желчные кислоты действуют как детергенты, располагаясь на поверхности капель жира и снижая поверхностное натяжение. В результате крупные капли жира распадаются на множество мелких, т.е. происходит эмульгирование. Из крупной капли жира образуется 10^{12} мелких капель.

Гидролиз жиров осуществляется панкреатической липазой. Панкреатическая липаза выделяется в полость тонкой кишки из поджелудочной железы (ПЖЖ) в виде неактивной пролипазы. Превращение в активную липазу происходит при участии желчных кислот и еще одного белка панкреатического сока - колипазы. Этот фермент, также секретируемый в виде зимогена, активируется при гидролизе трипсином специфических пептидных связей. Активная колипаза образует с липазой комплекс в молярном отношении 1:1 за счет формирования двух ионных связей Lys-Glu и Asp-Arg.

Колипаза своим гидрофобным доменом связывается с эмульгированным жиром. Другая часть молекулы колипазы способствует формированию такой конформации панкреатической липазы, при которой активный центр фермента максимально приближен к молекуле жира, поэтому скорость гидролиза жира резко возрастает (рис. 21.2).

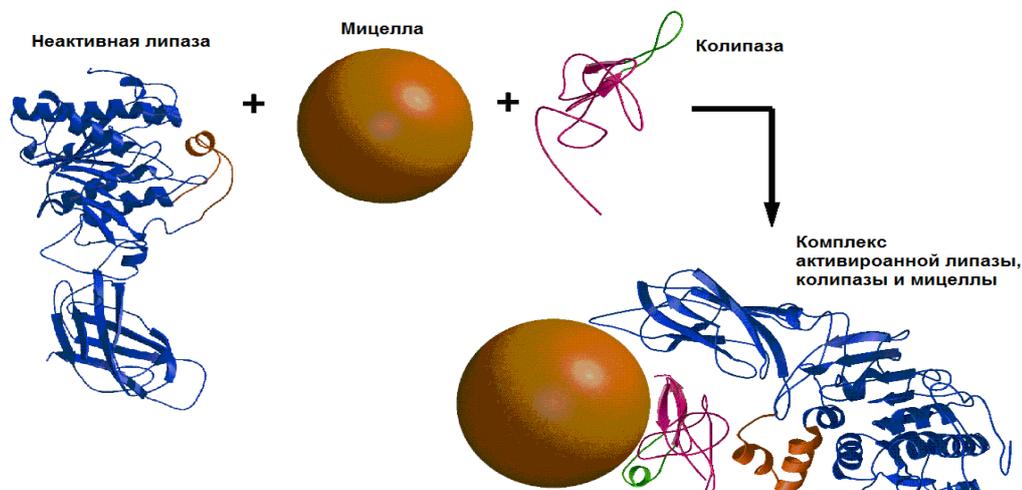
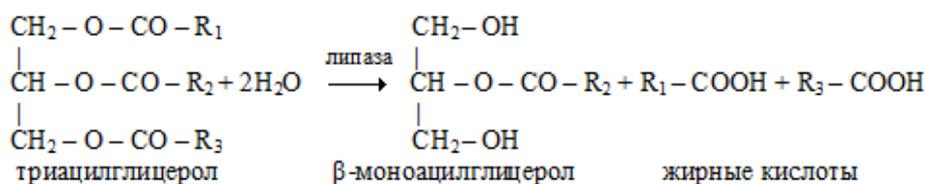
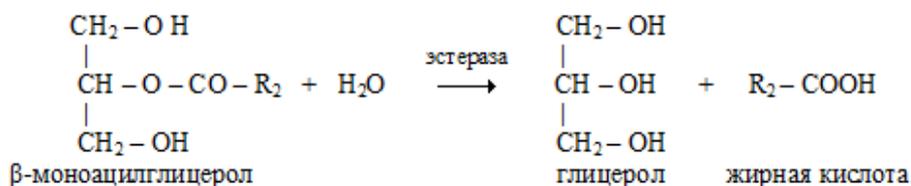


Рис.21.2. Взаимодействие неактивной панкреатической липазы, смешанной мицеллы и колипазы

Панкреатическая липаза гидролизует жиры преимущественно в 1 и 3 позициях (внешние сложноэфирные связи), поэтому основными продуктами гидролиза являются свободные ЖК и β-моноацилглицерол (2-моноацилглицерол, 2-МАГ). Молекулы 2-МАГ также обладают детергентными свойствами и способствуют эмульгированию жира.



β-Моноацилглицеролы всасываются стенкой кишечника и либо участвуют в ресинтезе триацилглицеролов уже в кишечной стенке, либо распадаются до глицерола и высшей жирной кислоты под действием неспецифических эстераз.



На скорость катализируемого липазой гидролиза триацилглицеролов не оказывает существенного влияния ни степень ненасыщенности жирной кислоты, ни длина ее цепи (от C₁₂ до C₁₈).

У растений в семенах и вегетативных органах присутствуют липазы, специфичность которых не выявлена. В дрожжевых грибах найдена липаза, способная отщеплять жирную кислоту как из α-, так и β-позиции.

Общепринято деление липаз на простые липазы, катализирующие гидролиз свободных триацилглицеролов, и липопротеинлипазы, гидролизующие связанные с белками липиды.

Глицерофосфолипиды расщепляются под действием фосфолипаз. Существует четыре типа этих ферментов: фосфолипаза A₁, A₂, C и D. Фосфолипаза A₁ отщепляет остаток жирной кислоты у C₁ атома. Фосфолипаза A₂ расщепляет β-сложноэфирную связь, фосфолипаза C отщепляет полярную головку вместе с остатком фосфорной кислоты, при этом продуктами гидролиза являются 1,2-диацилглицерол и фосфохолин. Фосфолипаза D, встречающаяся главным образом у растений, катализирует отщепление от фосфолипида полярной группы (азотистого основания) с образованием в качестве продукта фосфатидной кислоты ([рис. 21.3](#)):

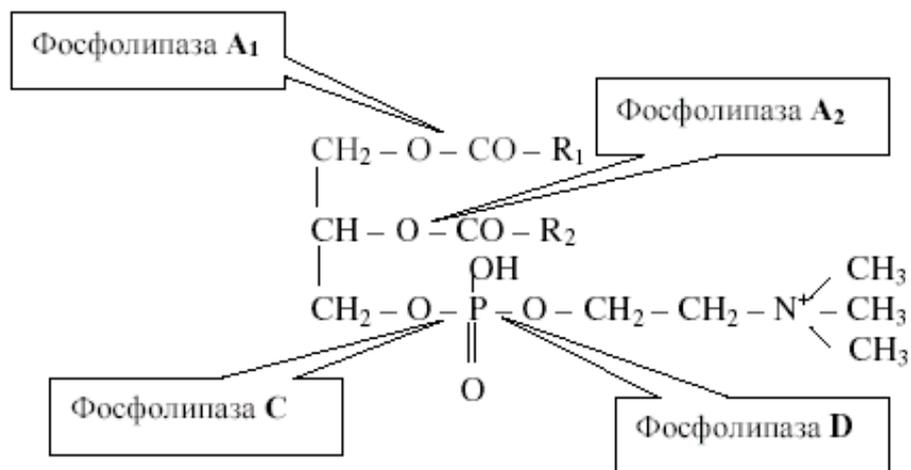


Рис.21.3. Расщепление сложноэфирных связей фосфолипазами

Фосфолипаза A₂ (ФЛА₂) гидролизует глицерофосфолипиды с образованием лизофосфолипидов. Лизофосфолипиды – эффективные эмульгаторы жира. Они, в свою очередь, под действием лизофосфолипазы, гидролизующей сложноэфирную связь у C₁ атома, расщепляются на жирную кислоту и глицерофосфохолин, который хорошо растворяется в водной среде и всасывается из кишечника в кровь. Глицерофосфохолин также может расщепляться гидролазой до глицерол-3-фосфата и холина. ФЛА₂ – неактивна, активируется путем частичного протеолиза, нуждается в Ca²⁺.

Холестерол в пищевых продуктах содержится частично в свободном (неэстерифицированном) виде, частично в виде эфиров с жирными кислотами. Эфиры холестерола гидролизуются под действием особого фермента холестеролэстеразы, который синтезируется в ПЖЖ и секретируется в кишечник. Продуктами гидролиза являются свободный холестерол (ХС) и ЖК. Активность фермента проявляется в присутствии желчных кислот.

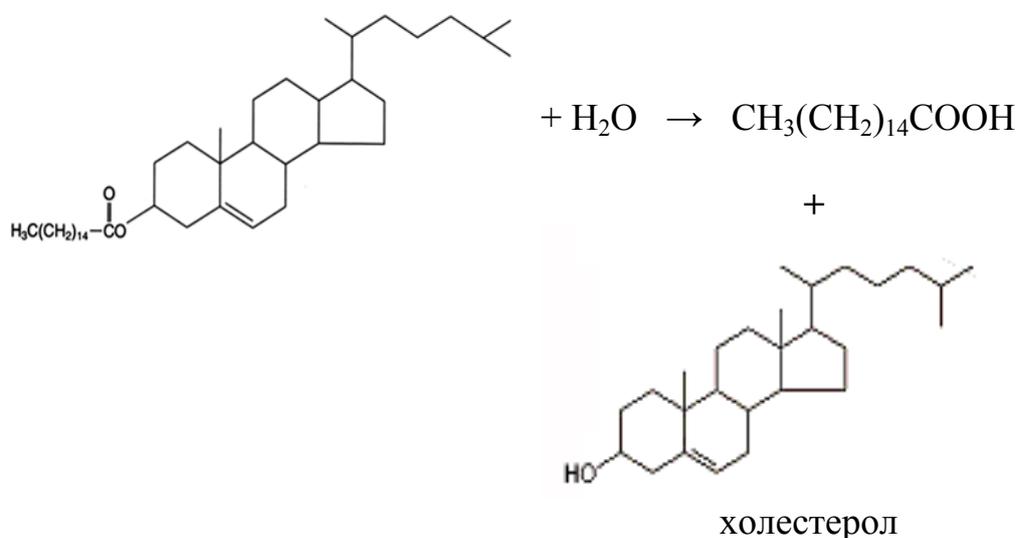


Рис. 21.4. Гидролиз пальмитохолестерида холестеролэстеразой

Всасывание продуктов расщепления липидов

В желчном пузыре из желчных кислот, фосфолипидов и холестерина образуются простые мицеллы (соотношение компонентов 12,5:2,5:1). Простые мицеллы выделяются в просвет 12-перстной кишки, где и взаимодействуют с 2-МАГ, α - и β -ДАГ, ХС и ЖК, образуя смешанные (сложные) мицеллы. В гидрофобное ядро смешанной мицеллы входят ЖК, ХС, β -МАГ и α - и β -ДАГ, снаружи располагаются фосфолипиды, лизофосфолипиды и желчные кислоты (рис. 21.5). Смешанная мицелла в 100 раз меньше эмульгированной капли жира, поэтому проходит через стенку кишечного эпителия либо путем мицеллярной диффузии, либо – пиноцитоза. Вместе с продуктами гидролиза липидов всасываются жирорастворимые витамины А, D, E, К и соли желчных кислот.

В эпителиальных клетках ворсинок кишечника сложные мицеллы распадаются на желчные кислоты и продукты гидролиза липидов. Желчные кислоты всасываются в кровь и через портальную вену попадают в печень, затем в желчный пузырь, откуда они снова секретируются в кишечник в виде простых мицелл. Этот процесс, называемый энтерогепатической циркуляцией, обеспечивает многократное использование желчных кислот. В организме 3-5 г желчных кислот за сутки совершает 5-10 оборотов, обеспечивая всасывание 80-100 г жиров (через 10 дней пул желчных кислот обновляется).

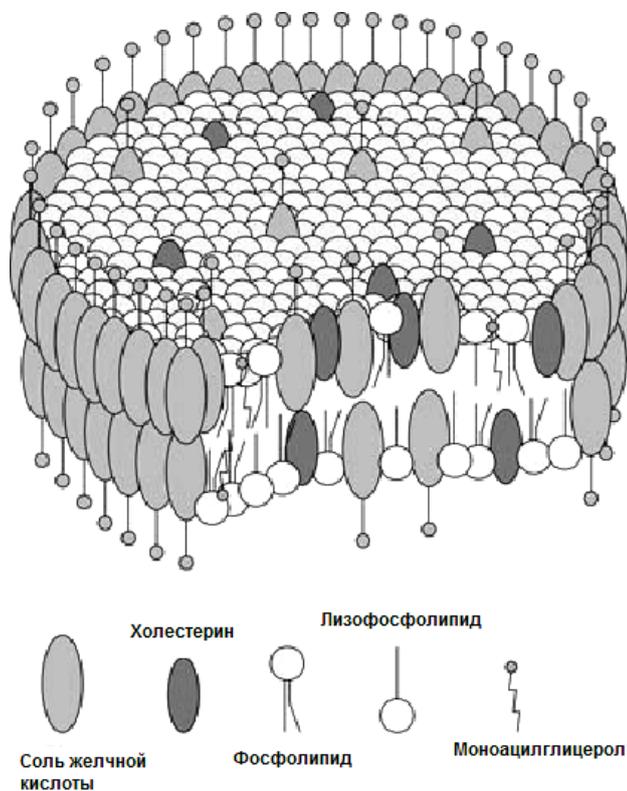


Рис. 21.5. Строение смешанной мицеллы

Смешанные мицеллы построены таким образом, что гидрофобные части молекул обращены внутрь мицеллы, а гидрофильные – наружу. Гидро-

фильная оболочка состоит из желчных кислот и фосфолипидов, поэтому мицеллы хорошо растворимы в водной фазе содержимого тонкой кишки. Мицеллы стабильны, они сближаются со щеточной каемкой клеток слизистой оболочки тонкого кишечника и липидные компоненты мицеллы диффундируют через мембраны внутрь клеток.

В эпителиальных клетках слизистой тонкого кишечника происходит ресинтез триацилглицеролов, характерных для того или иного организма и существенно отличающихся по своему строению от пищевого жира. Это обусловлено вовлечением в синтез триацилглицеролов жирных кислот не только экзогенного, но и эндогенного происхождения. Жирные кислоты с короткой углеродной цепью (менее 10 атомов углерода) и глицерол хорошо растворимы в воде и поэтому свободно всасываются в кровь воротной вены, отсюда – в печень, минуя какие-либо превращения в кишечной стенке. В энтероцитах, наряду с ресинтезом триацилглицеролов, происходит также ресинтез и фосфолипидов.

Процесс катаболизма тканевых липидов осуществляется в основном в жировой ткани при участии ацилглицероллипаз. В жировой ткани имеются три фермента, три-, ди- и моноацилглицероллипазы, участвующие в поэтапном расщеплении жиров. Высвободившиеся жирные кислоты поступают в кровь, где связываются сывороточным альбумином и транспортируются к различным органам.

Активность липаз регулируется ковалентной модификацией по типу фосфорилирование-дефосфорилирование. На [рис. 21.6](#) приведен пример гормональной регуляции активности триацилглицероллипазы и диацилглицероллипазы cAMP-зависимой протеинкиназой А в адипоцитах.

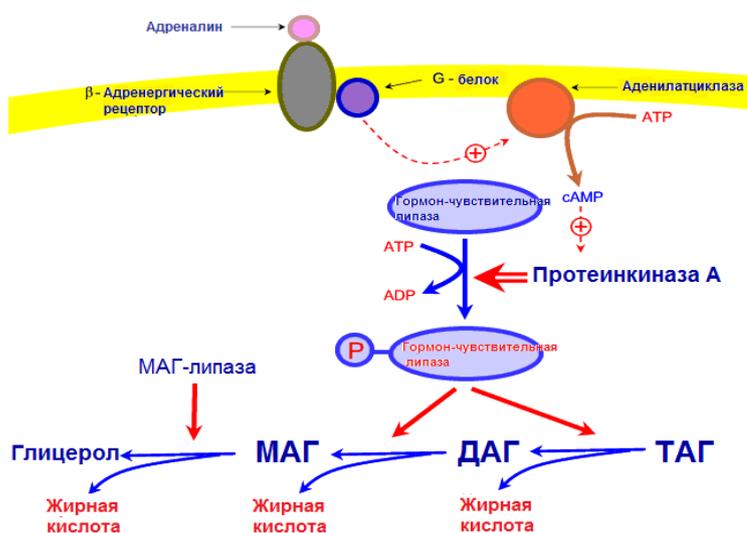


Рис.21.6. Гормон-индуцируемый гидролиз триацилглицеролов в адипоцитах

Транспорт липидов

Транспортными формами липидов являются липопротеины – сферические частицы с гидрофильной оболочкой, образованной фосфолипидным монослоем, апобелками, свободным холестерином, и гидрофобным ядром, состоящим из эфиров холестерина и триацилглицеролов. Известны четыре основных класса липопротеинов крови: хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и множество промежуточных форм липопротеинов.

ХМ образуются в энтероцитах из ресинтезированных липидов экзогенного происхождения. Они сначала проникают в лимфатическую систему, затем в общий кровоток, где на уровне капилляров различных тканей подвергаются катаболизму под действием липолитического фермента – липопротеинлипазы. Этот фермент активируется при наличии в крови гепарина и при контакте с апобелком, находящемся на оболочке ХМ. Продукты гидролиза – свободные жирные кислоты и глицерол переходят в ткани, где либо окисляются, либо вновь подвергаются эстерификации. В цитозоле клеток многих тканей обнаружен белок, связывающий жирные кислоты, получивший название Z-белка. Считают, что подобно сывороточному альбумину, осуществляющему внеклеточный транспорт длинноцепочечных жирных кислот, Z-белок обеспечивает их внутриклеточный транспорт.

Хиломикроны, обедненные ТАГ в результате катаболизма, превращаются в остаточные (ремнантные) формы, которые утилизируются печенью. Таким образом, хиломикроны снабжают ткани жирными кислотами. Максимальная концентрация ХМ в плазме крови отмечается в абсорбтивную фазу после приема жирной пищи, через 4-6 ч они практически исчезают из крови. В крови, взятой натощак, ХМ в норме почти нет.

ЛПОНП в небольшом количестве образуются в энтероцитах тонкого кишечника и поступают в кровь. Основным местом их образования является печень. ЛПОНП транспортируют, в основном эндогенные ТАГ и ХС из печени. Катаболизм их осуществляется в крови под действием тех же липолитических ферментов, которые гидролизуют ТАГ в составе ХМ, в результате чего ЛПОНП теряют большую часть ТАГ. В крови ЛПОНП интенсивно обмениваются, забирая у зрелых ЛПВП часть холестерина, теряя ТАГ, апобелки Е и С. Метаболизм ЛПОНП в крови приводит к трансформации их в ЛПНП.

ЛПНП – основные холестеролпереносящие липопротеины, образуются в крови, в основном из ЛПОНП. Транспортируются кровью к тем внепеченочным тканям, на поверхности которых имеется большое количество белков-рецепторов ЛПНП (надпочечники, половые железы, селезенка, кожа и др.).

Апобелок В100, находящийся в оболочке ЛПНП, контактирует с белком-рецептором ЛПНП, в результате чего ЛПНП затягивается в окаймленную ямку, образованную мембранным белком клатрином, которая далее трансформируется в окаймленную везикулу, затем – в эндосому, сливаю-

щуются с лизосомой. Ферменты лизосомы гидролизуют содержимое ЛПНП: апобелок до аминокислот, ТАГ, ФЛ и ЭХС – на составляющие их компоненты.

Метаболизм глицерола

Глицерол, образующийся при гидролизе ТАГ и глицерофосфолипидов, – хороший энергетический субстрат и используется в этих целях практически всеми органами и тканями. В отличие от ЖК, глицерол водорастворим. Независимо от того, вступает ли он на ресинтез жиров или будет подвергаться дальнейшему расщеплению, глицерол, прежде всего, фосфорилируется. Донором фосфатных групп служит АТФ. Реакция фосфорилирования катализируется глицеролкиназой.

Лекция 22

Катаболизм жирных кислот

Свободные жирные кислоты образуются при расщеплении экзогенных и эндогенных липидов. Последние чаще всего представлены триацилглицеролами, которые откладываются в клетках в качестве резервного источника энергии и углерода. Кроме того, клетки используют и полярные липиды мембран, метаболическое обновление которых происходит постоянно. Свободные жирные кислоты, образующиеся в процессе липолиза, могут реутилизироваться в ходе анаболических процессов или подвергаться дальнейшему расщеплению. Большинство аэробных клеток способны к полному окислению жирных кислот до углекислого газа и воды.

Катаболизм жирных кислот в живых организмах протекает в три стадии: 1) β -окисление – специфический путь окисления свободных жирных кислот, заканчивающийся образованием ацетил-СоА; 2) цикл лимонной кислоты, в котором осуществляется расщепление ацетильных остатков, образовавшихся при β -окислении ЖК; 3) окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи с образованием АТФ за счет энергии NADH и FADH₂ ([рис. 22.1](#)).

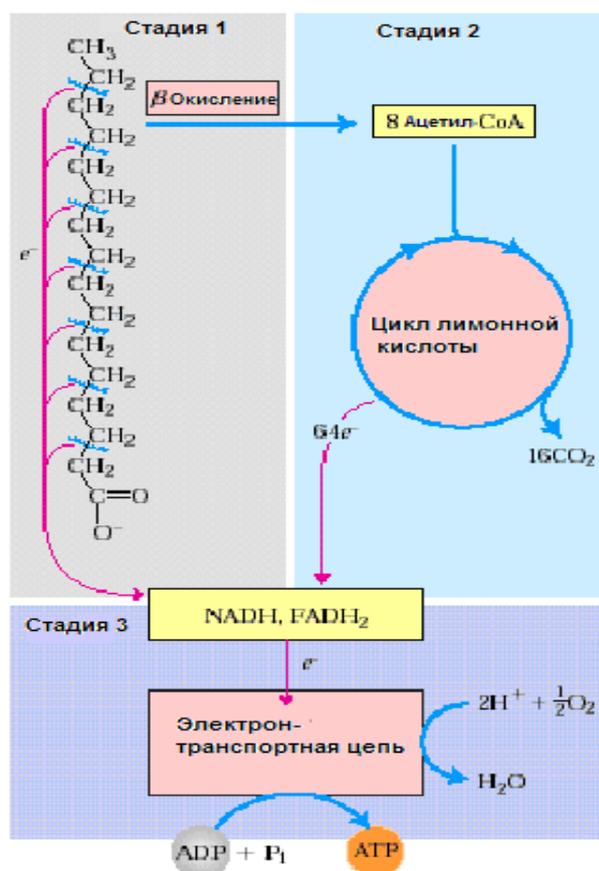


Рис.22.1. Три этапа β -окисления пальмитиновой кислоты

В начале 20 века Ф. Кнооп установил, что процесс расщепления жирных кислот происходит путем последовательного отщепления двууглеродных фрагментов (CH₃COO⁻), начиная с карбоксильного конца молекулы.

Ф. Кнооп назвал этот процесс β -окислением, чтобы подчеркнуть, что каждый раз перед расщеплением связи C _{α} -C _{β} происходит окисление β -углеродного атома. Химизм этого процесса с детальным описанием отдельных стадий и ферментов был изучен спустя примерно 50 лет после открытия Ф. Кноопа в работах А. Ленинджера, Ф. Линена, Ю. Кеннеди.

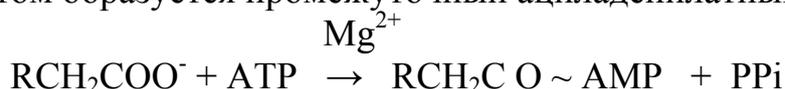
β -окисление — основной путь катаболизма жирных кислот, менее значимым является α -окисление и ω -окисление. Прежде чем вступить на путь окисления, жирная кислота должна быть активирована.

Активация жирной кислоты

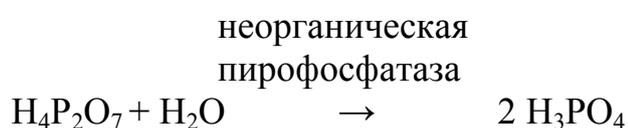
Свободные ЖК превращаются в тиоэфиры коэнзима А (HSCoA) – активированную, высокоэнергетическую форму. В процессе активации принимает участие ацил-СоА-синтетаза, использующая молекулу АТФ для образования продукта реакции с макроэргической ацилтиоэфирной связью. Известно три типа ацил-СоА-синтатез, характеризующихся различной субстратной специфичностью. Одна из них проявляет высокую специфичность в отношении ацетата (двууглеродного соединения — C₂), другая — к жирным кислотам

со средней длиной цепи (C₄-C₁₂), третья специфична к жирным кислотам с большой длиной цепи (C₁₄-C₂₂). Два последних фермента участвуют в катаболизме как насыщенных, так и ненасыщенных жирных кислот. У прокариот ацил-СоА-синтетазы являются отдельными ферментами, присоединенными к плазматической мембране. У эукариот эти ферменты находятся во внешней мембране митохондрий.

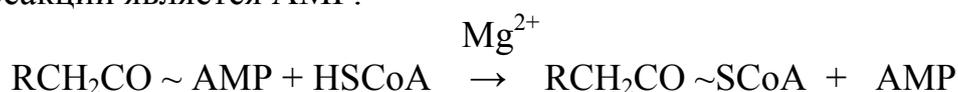
Активация жирной кислоты является двустадийным процессом. На первой стадии происходит взаимодействие жирной кислоты с молекулой АТФ, при этом образуется промежуточный ациладенилатный комплекс.



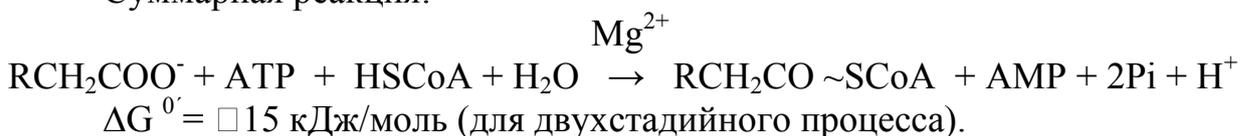
Ациладенилат остается связанным с ферментом, а пиррофосфат под действием неорганической пиррофосфатазы расщепляется на две молекулы ортофосфата.



На второй стадии ациладенилатный комплекс взаимодействует с HSCoA, в результате образуется тиоэфир жирной кислоты, вторым продуктом реакции является AMP.



Суммарная реакция:



Дальнейшее расщепление CoA-производных жирных кислот осуществляется в матриксе митохондрий. Молекулы ацил-СоА способны проникать через внешнюю митохондриальную мембрану, но внутренняя мембрана является для них непреодолимым барьером. Существует специальный механизм, благодаря которому ацил-СоА преодолевают и внутреннюю митохондриальную мембрану.

Транспорт ацил-СоА в митохондри

В транспорте ацил-СоА участвуют карнитин, который связывает молекулу жирной кислоты особым образом, в результате чего положительный (на атоме азота) и отрицательный (на атоме кислорода карбоксильной группы) заряды оказываются сближенными и нейтрализуют друг друга, и три белка - карнитинацилтрансфераза I, локализованная во внешней митохондриальной

мембране, карнитинацилкарнитин-транслоказа и карнитинацилтрансфераза II, локализованные во внутренней мембране митохондрий (рис. 22.2).

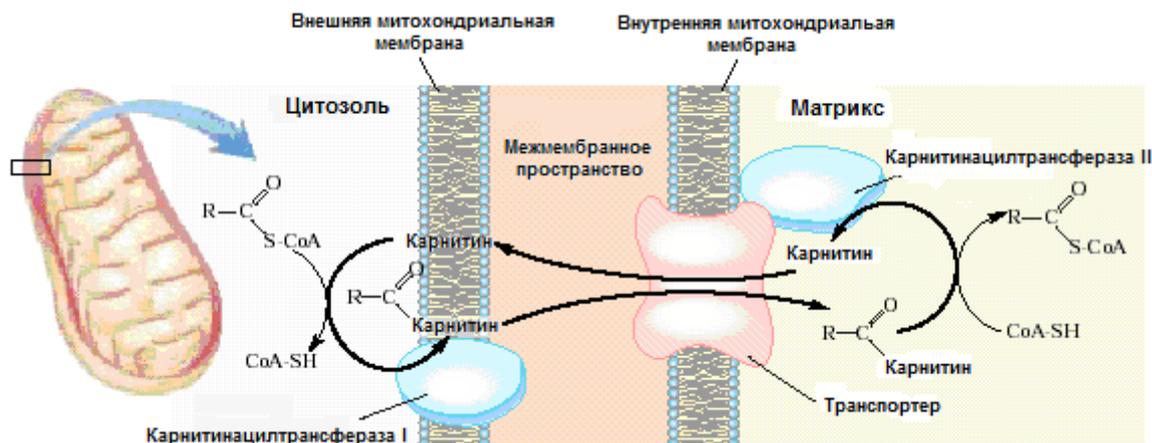


Рис.22.2. Транспорт длинноцепочечных ацил-СоА из цитозоля в матрикс митохондрий

СоА-эфиры жирных кислот взаимодействуют с гидроксигруппой карнитина (γ -триметиламино- β -оксибутират). На внешней стороне наружной мембраны протекает *транс*-этерификация, катализируемая карнитинацилтрансферазой I, и полученный сложный эфир поступает в матрикс, причем его диффузия усиливается специальным ацилкарнитин/карнитин-транспортером, локализованным во внутренней мембране митохондрий.

Процесс завершается переносом ацильного остатка от карнитина к внутримитохондриальному СоА при участии фермента карнитинацилтрансферазы II, локализованной на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны. Транспорт ацил-СоА, опосредованный карнитином, является стадией, лимитирующей скорость окисления жирных кислот.

β -окисление жирных кислот

β -окисление — циклический процесс, каждый цикл которого заключается в удалении двууглеродного фрагмента в форме ацетил-СоА, начиная от карбоксильного конца жирной кислоты. Цикл включает четыре реакции: дегидрирование, гидратацию, дегидрирование и тиолитическое расщепление. На рис. 22.3 приведена схема β -окисления насыщенной жирной кислоты с четным числом атомов углерода.

В первой реакции происходит окисление ацил-СоА при участии FAD-зависимой ацил-СоА-дегидрогеназы. Три вида ацил-СоА-дегидрогеназ осуществляют окисление длинно-, средне- и короткоцепочечных ацил-СоА эфиров жирных кислот. Образовавшийся в реакции FADH₂ в составе ацил-дегидрогеназы окисляется другим флавопротеином, переносящим электроны в митохондриальную электронтранспортную цепь и далее к кислороду. При этом происходит синтез АТФ (два моля на одну пару перенесенных электронов). Окисление с участием ацил-СоА-дегидрогеназ, аналогично дегидриро-

ванию, катализируемому сукцинатдегидрогеназой в цикле лимонной кислоты.

Продукт окисления \square еноил-СоА гидратируется под действием еноил-гидратазы с образованием β -гидроксиацил-СоА. Существуют еноил-СоА-гидратазы, проявляющие специфичность к *цис*- или *транс*-формам еноил-СоА-производных жирных кислот. При этом *транс*-еноил-СоА гидратируется стереоспецифически в L- β -гидроксиацил-СоА, *цис*-изомеры \square в D- β -гидроксиацил-СоА.

В третьей реакции цикла β -окисления происходит дегидрирование L- β -гидроксиацил-СоА специфической только к L-изомерам β -гидроксиацил-СоА NAD^+ -зависимой дегидрогеназой. Окисление подвергается β -углеродный атом молекулы. Образующийся β -кетоацил-СоА в завершающей реакции цикла легко расщепляется тиолазой с образованием двух продуктов: ацил-СоА, укороченного по сравнению с исходным на два углеродных атома, и ацетил-СоА \square двууглеродной молекулы, отщепленной от жирнокислотной цепи. Ацил-СоА-производное подвергается следующему циклу реакций β -окисления, а ацетил-СоА вступает в цикл лимонной кислоты для дальнейшего окисления.

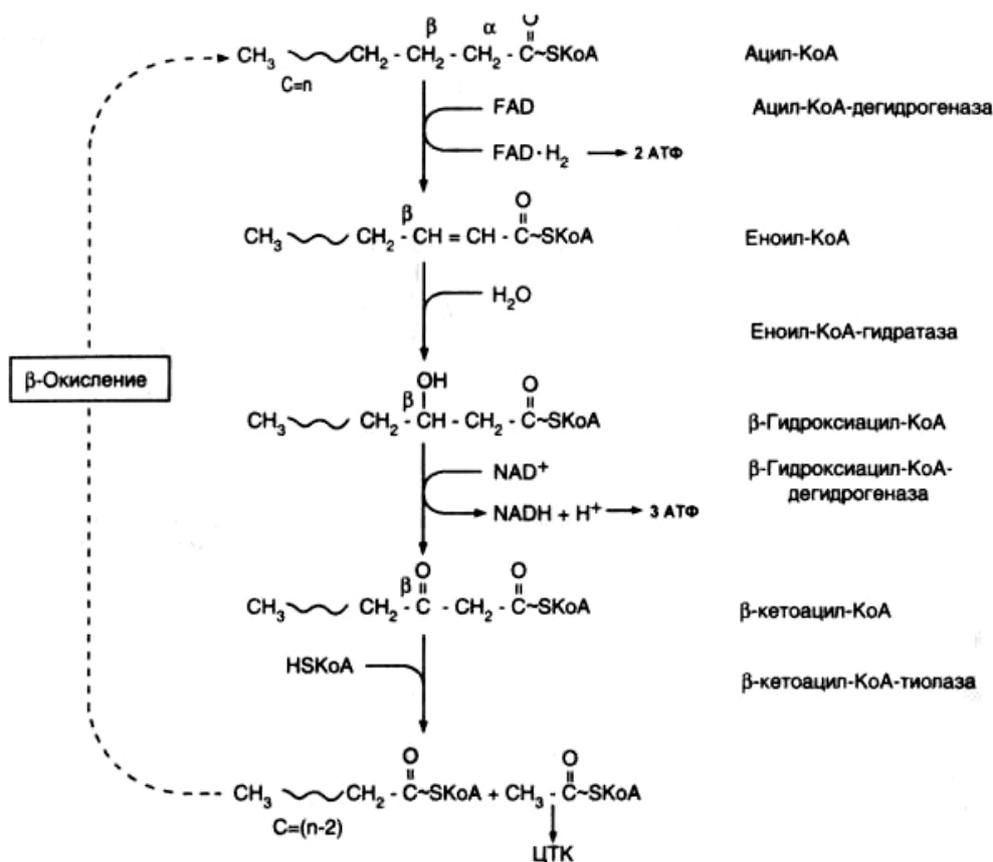


Рис.22.3. β -окисление насыщенных жирных кислот

Рассмотрим энергетический баланс окисления на примере стеариновой кислоты.

Уравнение β -окисления стеариол-СoA:



Ацетил-СoA, образованный при окислении жирных кислот, далее подвергается окислению до CO_2 и H_2O в цикле лимонной кислоты. Следующее уравнение \square результат окисления стеариол-СoA в ЦТК (9 циклов):



Уравнения окислительного фосфорилирования:



Комбинируя уравнения (22-2) и (22-3), получаем окончательное уравнение полного окисления стеариол-СoA до CO_2 и H_2O (исходя из предположения, что $\text{GDP} = \text{ADP}$ и $\text{GTP} = \text{ATP}$):



Таким образом, катаболизм жирных кислот обеспечивает продукцию энергии. Расчет выделяемой энергии удобно проводить по формуле:

$$[5(n/2 \square 1) + n/2 \cdot 12 \square 2],$$

где $5 \square$ число молекул АТФ, образуемое при одном акте β -окисления; $n \square$ число атомов углерода в ЖК; $n/2 \square 1 \square$ число актов окисления; $n/2 \square$ число молекул ацетил-СoA; $12 \square$ число молекул АТФ, образующихся при полном окислении одной молекулы ацетил-СoA в цикле лимонной кислоты; $2 \square$ число молекул АТФ, затраченных на активацию жирной кислоты.

При полном β -окислении стеариновой кислоты образуется 148 молекул АТФ. С учетом двух молекул АТФ, затраченных на активирование молекулы стеарата (образование стеариол-СoA), общий энергетический выход при окислении одной молекулы стеариновой кислоты в организме животных и человека составит $148 \square 2 = 146$ молекул АТФ. Рассчитано, что около 40% от всей потенциальной энергии стеариновой кислоты при ее окислении в организме используется для ресинтеза АТФ, а оставшаяся часть теряется в виде тепла. Наиболее активно β -окисление протекает в митохондриях печени, почек, скелетной и сердечной мышц.

Примечание: β -окисление является источником эндогенной воды.

Катаболизм ненасыщенных жирных кислот

Окисление ненасыщенных жирных кислот происходит с соблюдением всех закономерностей β -окисления, но через дополнительные стадии, природа которых зависит от положения и геометрии двойной связи (связей) в обычных ненасыщенных жирных кислотах. Рассмотрим в качестве примера β -окисление олеиновой кислоты ($C_{18:1}, \Delta^9$). Первые три цикла окисления приводят к образованию жирной кислоты с *цис*- Δ^3 -конформацией двойной связи (рис. 22.4).

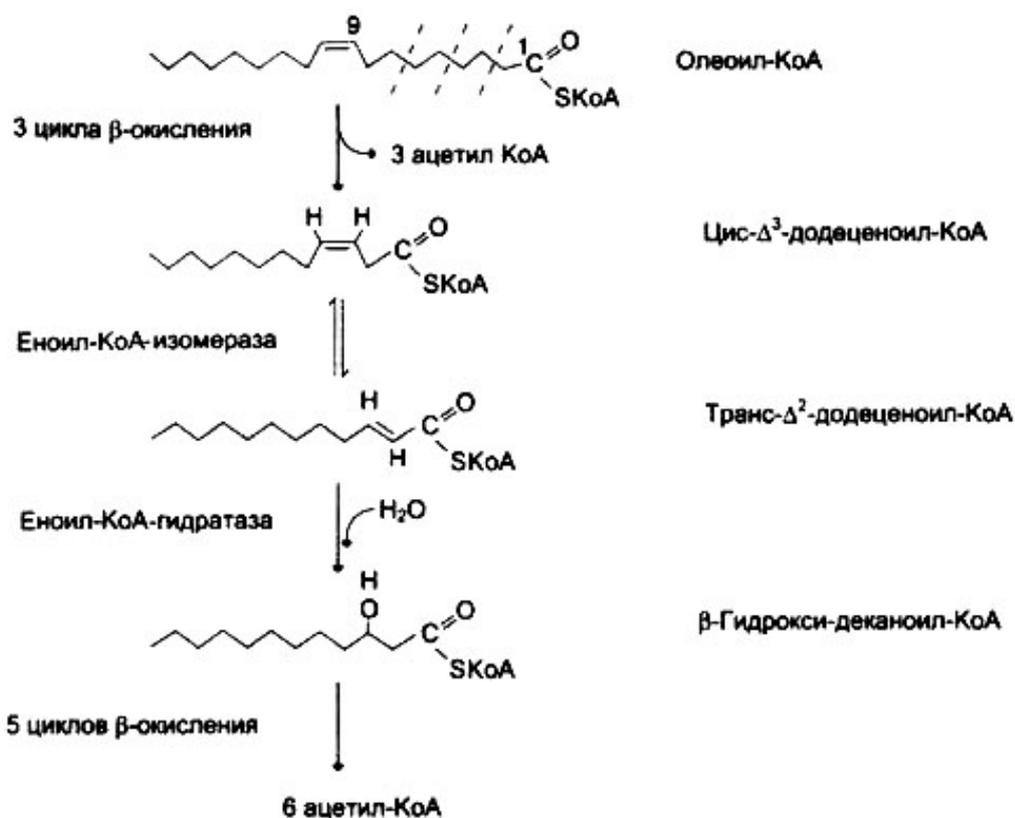


Рис.22.4. β -окисление моноеновых жирных кислот

Чтобы смогла осуществиться следующая стадия \square гидратация с участием еноил-СоА-гидратазы, необходимо чтобы двойная связь в молекуле СоА-производного жирной кислоты переместилась из положения 3-4 в положение 2-3 и изменилась ее конфигурация из *цис*- в *транс*-. Это препятствие преодолевается с помощью дополнительного фермента *цис,транс*-изомеразы, катализирующей двойную изомеризацию \square изменяются и положение и геометрия двойной связи. После завершения изомеризации процесс β -окисления идет обычным путем.

При окислении линолевой кислоты ($C_{18:2}, \Delta^{9,12}$) с двумя *цис*-двойными связями первые три цикла β -окисления приведут к образованию 12-углеродной кислоты с *цис*-двойными связями в положении 3 и 6. Это соеди-

нение не является субстратом ни для ацил-СоА-дегидрогеназы, ни для еноил-СоА-гидратазы в ходе β -окисления. В частности, как отмечено ранее, для гидратазы необходима *транс*-двойная связь между углеродными атомами 2 и 3. Кроме того, через следующие два цикла образуется ненасыщенная кислота с двойной связью в α,β -положении, но с *цис*-геометрией. В результате реакции гидратации данного соединения образуется D-изомер β -гидроксипродукта, который не может быть использован в качестве субстрата L- β -гидроксиацил-СоА-дегидрогеназой. Поэтому в случае окисления такой кислоты, как линолевая, необходимо участие не только *цис-транс*-изомеразы, но и второго дополнительного фермента \square эпимеразы, катализирующий D \leftrightarrow L превращение. После этого β -окисление проходит без помех. Такой метаболит служит субстратом еноил-гидратазы, превращающей *транс*-еноил-СоА в L- β -гидроксиацил-СоА.

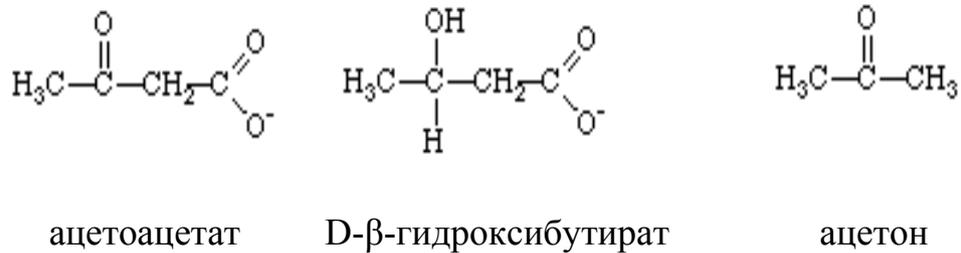
Скорость окисления ненасыщенных жирных кислот выше, чем насыщенных жирных кислот.

Катаболизм жирных кислот с нечетным числом атомов углерода

Природные липиды в подавляющем большинстве содержат жирные кислоты с четным числом углеродных атомов. Однако в липидах многих растений и некоторых морских организмов присутствуют жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода. Кроме того, у жвачных животных при переваривании углеводов в рубце образуется большое количество пропионовой кислоты, которая содержит три углеродных атома.

Пропионат всасывается в кровь и окисляется в печени и других тканях. Установлено, что жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов окисляются таким же образом, как и жирные кислоты с четным числом углеродных атомов, с той лишь разницей, что на последнем этапе β -окисления образуется одна молекула пропионил-СоА и одна молекула ацетил-СоА, а не две молекулы ацетил-СоА. Далее пропионил-СоА подвергается биотин-зависимому карбоксилированию и V_{12} -зависимой внутримолекулярной перегруппировке, превращаясь в сукцинил-СоА, дальнейшее метаболическое превращение которого происходит в цикле лимонной кислоты ([рис. 22.5](#)).

тенсивно, то в крови появляются аномально высокие количества этих соединений, называемых кетоновыми телами.



На ранних стадиях кетоновые тела вызывают состояние, называемое ацидозом, на поздних — кетозом. Следствием является понижение pH крови под действием кислот, ацетоацетата и β-гидроксибутирата. Для кетоза характерно присутствие запаха ацетона в дыхании. Развитие этого состояния может перейти в кому и привести к смерти.

Синтез кетоновых тел (кетогенез) происходит в матриксе митохондрий печени. Жирные кислоты сначала расщепляются до ацетил-СоА в процессе β-окисления. Ацетил-СоА, прежде всего, используется как источник энергии для метаболических процессов, протекающих в печени. Часть ацетил-СоА может вовлекаться в кетогенез (рис. 22.7).

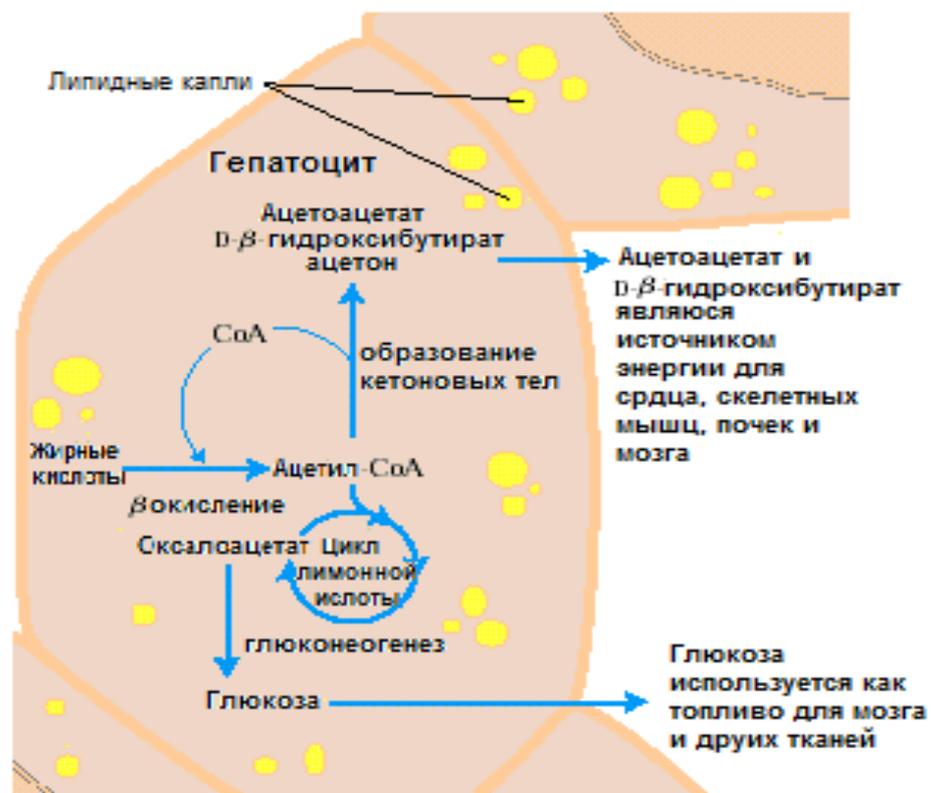


Рис. 22.7. Образование и экспорт кетоновых тел из печени

Химизм процесса кетогенеза в клетках печени приведен на [рис. 22.8](#).

- □ В реакции (1) осуществляется конденсация 2-х молекул ацетил-CoA при участии тиолазы. Образуется ацетоацетил-CoA и удаляется HSCoA.
- □ На второй стадии происходит включение третьей молекулы ацетил-CoA, но уже при участии другого фермента □ гидроксиметилглутарил-CoA-синтазы (ГМГ-CoA-синтазы) (2).
- □ Образующийся β-гидрокси-β-метилглутарил-CoA далее расщепляется под действием ГМГ-CoA-лиазы (3), регенерирующей ацетил-CoA и образующей продукт □ ацетоацетат.

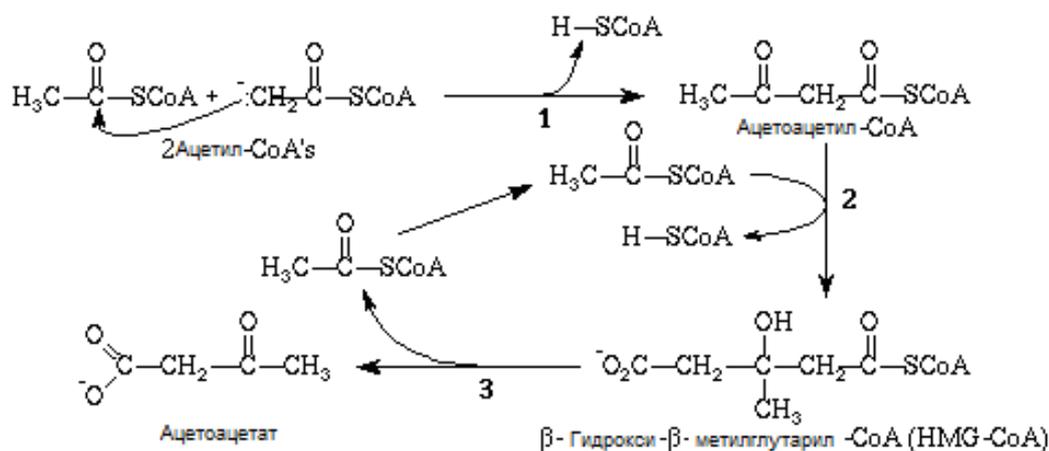
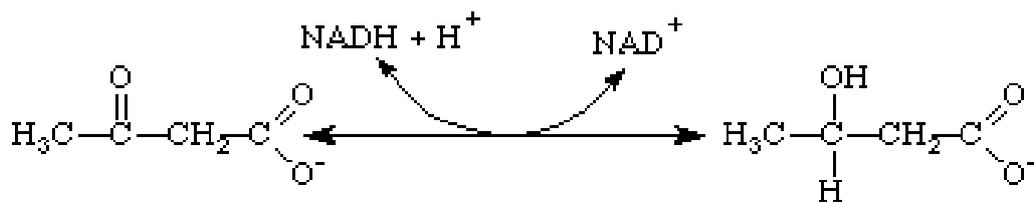


Рис.22.8. Синтез кетоновых тел в гепатоцитах

Ацетоацетат может восстанавливаться до D-β-гидроксибутирата при участии D-β-гидроксибутиратдегидрогеназы.



Кетоновые тела как источники энергии

Кетоновые тела □ водорастворимые соединения, поэтому легко транспортируются через внутреннюю мембрану митохондрий, также как и через гемато-энцефалический барьер и клеточные мембраны. В связи с этим они могут использоваться в качестве источника энергии различными тканями, включая ЦНС (рис. 22.10).

- □ D-β-гидроксибутират окисляется до ацетоацетата при участии NAD^+ -зависимой β-гидроксибутиратдегидрогеназы, при этом продуцируется молекула NADH (1).

• □ Следующая стадия □ присоединение HSCoA. Синтез ацетоацетил-СоА происходит путем реакции ацил-тиоэфирного обмена с участием сукцинил-СоА ферментом СоА-трансферазой (2). Сукцинил-СоА □ интермедиат цикла лимонной кислоты.

• □ При участии тиолазы (3) и еще одной молекулы HSCoA ацетоацетил-СоА расщепляется на 2 молекулы ацетил-СоА.

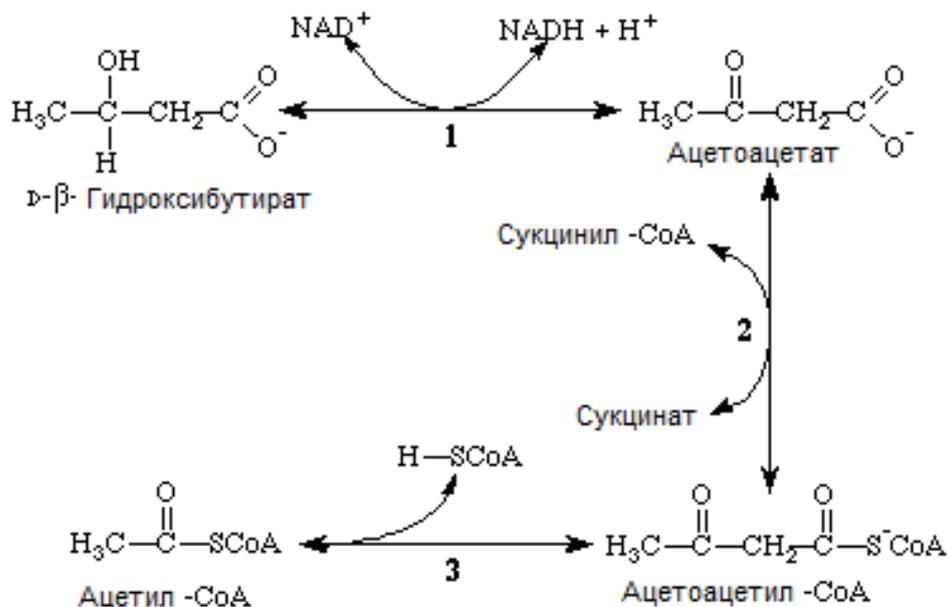


Рис.22.10. Кетоновые тела □ клеточное топливо

Кетоновые тела являются предпочтительными субстратами для аэробных мышц и сердца, чем глюкоза, когда они доступны. В периферических тканях кетоновые тела должны вновь превратиться в ацетил-СоА в митохондриях.

Глиоксилатный цикл

Растения и некоторые бактерии способны использовать ацетил-СоА, образующийся при катаболизме липидов (или из любого другого источника), не только для производства энергии, но и в качестве источника углерода для синтеза большинства других классов соединений. Животным также присуща такая универсальность, однако они существенно менее эффективно могут использовать углерод липидов для синтеза углеводов. Причина этого заключается в том, что растения и бактерии способны синтезировать два дополнительных фермента, изоцитрат-лиазу и малат-синтазу; оба этих фермента не синтезируются в организме животных.

Вместе с некоторыми ферментами цикла лимонной кислоты эти дополнительные ферменты участвуют в глиоксилатном цикле. В семенах растений,

запасующих масло, глиоксилатный цикл осуществляется в отдельных оргanelлах, глиоксисомах.

Пероксисомальная/глиоксисомальная система отличается от митохондриальной двумя аспектами:

1) в первой окислительной реакции электроны переносятся на кислород, образуя воду, и 2) восстановленный NAD, образованный во второй окислительной реакции не реокисляется в пероксисомах или глиоксисомах, поэтому восстановительные эквиваленты переносятся в цитозоль и далее транспортируются в митохондрии (рис. 22.11).

Митохондрия

Пероксисома/глиоксисома

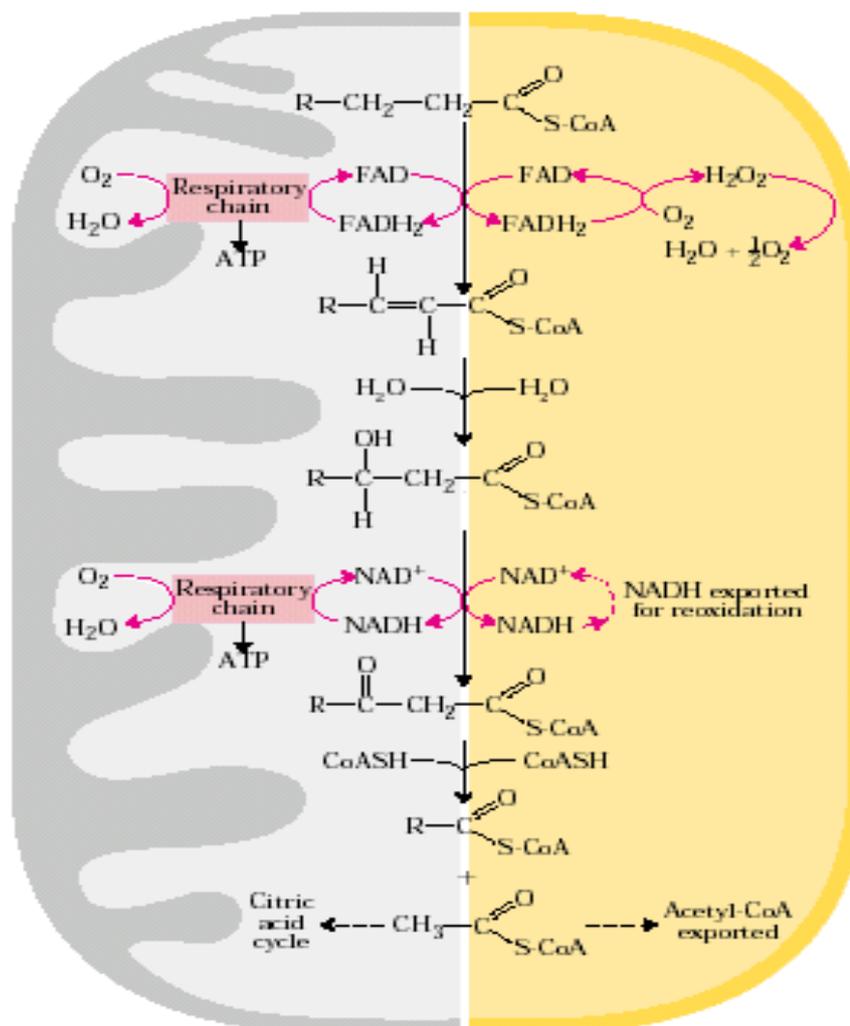


Рис. 22.11. Сравнение процесса β -окисления в митохондрии и пероксисоме/глиоксисоме

Ацетил-СоА, продуцированный в пероксисомах и глиоксисомах также экспортируется: ацетат из глиоксисом используется как биосинтетические

предшественники. Ацетил-СоА, образованный в митохондриях, в дальнейшем окисляется в цикле лимонной кислоты.

Лекция 23

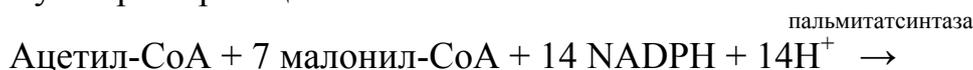
Биосинтез жирных кислот и триацилглицеролов

За исключением полиеновых эссенциальных жирных кислот (ЖК), все другие ЖК в организме животных и человека синтезируются. Синтез ЖК *de novo* называется липогенезом. Наиболее интенсивно липогенез происходит в печени. В качестве источника при синтезе ЖК используется ацетил-СоА. Углеродные цепи ЖК собираются в ходе последовательного присоединения двууглеродных фрагментов.

Липогенез не является процессом, обратным β -окислению. Он отличается от него по ряду параметров: 1) биосинтез ЖК осуществляется в основном в цитозоле; 2) источником двууглеродных фрагментов при наращивании цепи ЖК служит малонил-СоА, образующийся в результате присоединения CO_2 к ацетил-СоА; 3) на всех стадиях синтеза ЖК принимает участие ацилпереносчик белок – АПБ, а не HSCoA ; 4) для синтеза ЖК необходим NADPH , а в β -окислении в качестве кофермента используются FAD и NAD^+ ; 5) интермедиатами в ходе синтеза ЖК являются гидроксипроизводные, относящиеся к D-ряду, тогда как при окислении ЖК – гидроксипроизводные L-ряда.

В цитозоле осуществляется синтез насыщенных жирных кислот с длинной углеводородной цепи до C_{16} (пальмитат). В митохондриях и ЭПР может происходить дальнейшее наращивание углеводородных цепей, кроме того, в ЭПР осуществляется превращение насыщенных ЖК в ненасыщенные.

Суммарная реакция синтеза пальмитата:



Строение синтазы жирных кислот

Биосинтез ЖК осуществляется мультиферментным комплексом, который называется синтазой жирных кислот (пальмитатсинтаза, СЖК). Строение этого комплекса приведено на [рис. 23.1](#).

Мультиэнзимный комплекс синтазы ЖК у высокоорганизованных форм (млекопитающие, птицы, насекомые) характеризуется молекулярной массой 400-500 кДа, образован единственной полипептидной цепи, включающей около 2300 аминокислотных остатков. Этот комплекс состоит из двух идентичных субъединиц, т.е. является гомодимером. Каждая субъединица может катализировать семь различных реакций, из которых складыва-

ется синтез ЖК. Пространственное объединение нескольких реакций в мультиферментный комплекс (МФК) имеет ряд преимуществ по сравнению с отдельными ферментами: предотвращаются конкурентные реакции, последовательные реакции согласованы как на конвейере, реакции протекают эффективно, благодаря высокой концентрации субстрата и незначительным потерям его за счет диффузии.

У бактерий, таких, как *E. Coli* в синтезе ЖК участвуют семь отдельных ферментов и ацилпереносящий белок. Растения также имеют индивидуальные белки с различной активностью, которые ассоциированы в четвертичный комплекс.

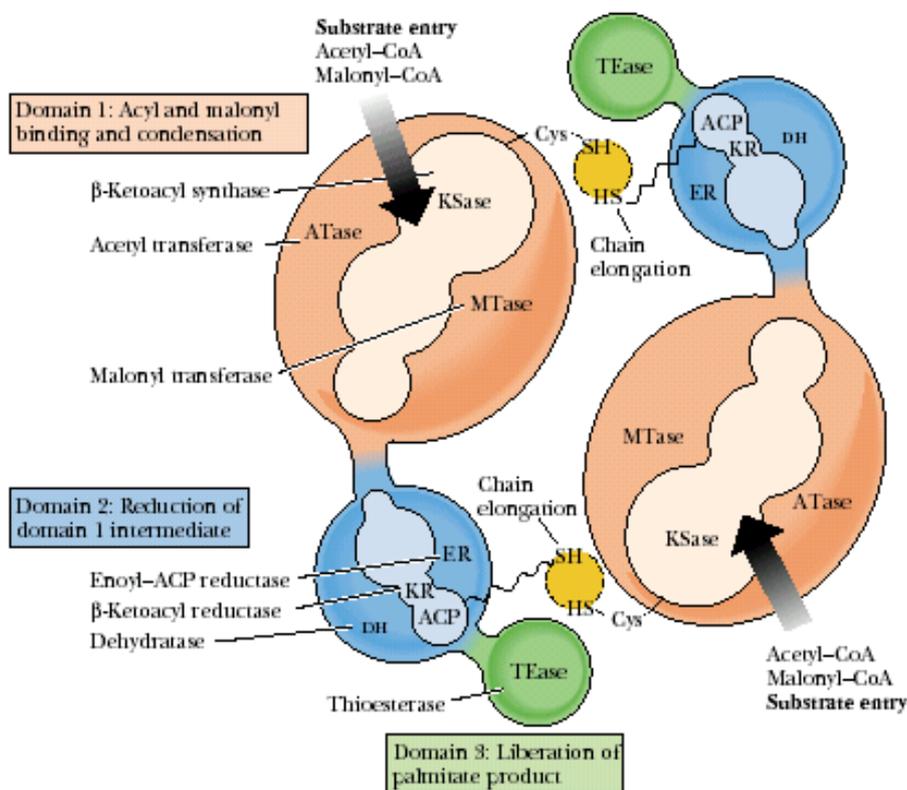


Рис.23.1. Комплекс синтазы жирных кислот млекопитающих

Каждая субъединица МФК включает три различных домена и восемь субдоменов.

Домен I состоит из трех субдоменов: субдомен 1 – АПБ-S-ацетилтрансфераза, 60 кДа; субдомен 2 – АПБ-S-малонилтрансфераза, 23 кДа; субдомен 3 – β -кетоацил-АПБ-синтаза (конденсирующий фермент, 45 кДа). Домен I катализирует присоединение субстратов ацетил-CoA и малонил-CoA ацетилтрансферазой и малонилтрансферазой соответственно и последующую конденсацию обоих партнеров β -кетоацил-синтазой.

Домен II также состоит из трех субдоменов: субдомен 4 – β -кетоацил-АПБ-редуктаза, 21 кДа; субдомен 5 – β -гидроксиацил-АПБ-дегидратаза, 50 кДа; субдомен 6 – еноил-АПБ-редуктаза, 14 кДа. К субдомену 4 присоединен

ацилпереносящий белок (АПБ), 15 кДа. Домен II восстанавливает растущую цепь ЖК с помощью вышеназванных трех ферментов.

Домен III содержит субдомен 7 – ацил-АПБ-гидролаза, тиоэстераза, 33 кДа. Домен III после семь циклов удлинения цепи катализирует высвобождение готового продукта – пальмитата с помощью гидролитического фермента тиоэстеразы.

Центральную роль в функционировании комплекса СЖК играет ацилпереносящий белок, простетической группой которого является 4-фосфопантетеин. Почти посередине полипептидной цепи этого белка находится остаток серина, к ОН-группе которого сложноэфирной связью присоединяется 4-фосфопантетеин, по структуре идентичный фосфопантетеиновой группе коэнзима А (рис. 23.2).

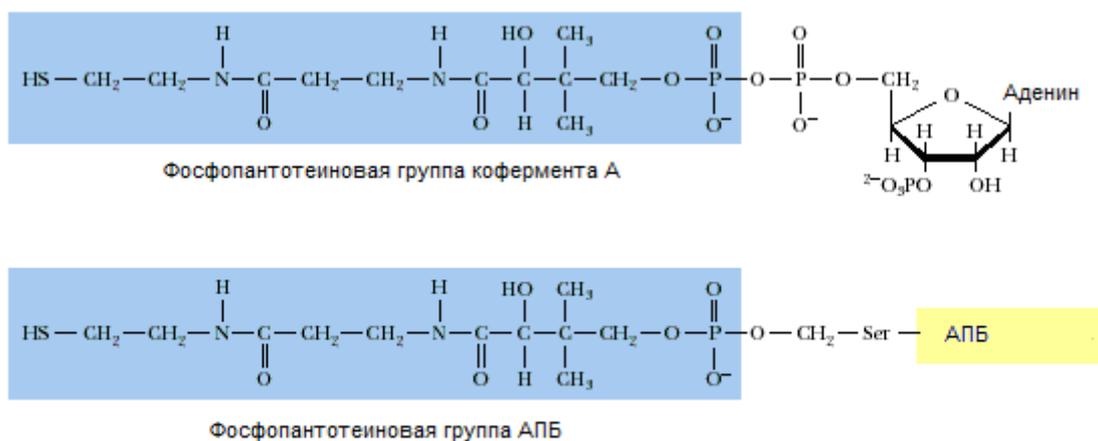


Рис.23.2. Фосфопантетеиновая группа коэнзима А и ацилпереносящего белка

Функция АПБ в биосинтезе ЖК аналогична функции CoA в β-окислении жирных кислот. В процессе наращивания цепи ЖК промежуточные продукты связаны с АПБ. Простетическая группа АПБ служит «вращающейся ручкой», которая перемещает промежуточные соединения от активного центра одного фермента к другому. Ацильные остатки прочно связываются с концевой SH-группой АПБ, что предотвращает обмен метаболитами, образующимися в процессе синтеза и распада ЖК. Кроме HS-группы АПБ в синтазе жирных кислот есть еще одна SH-группа, принадлежащая специфическому остатку цистеина в молекуле β-кетоацил-синтазы. Обе эти SH-группы участвуют в биосинтезе жирных кислот. Растущая цепь ЖК всегда связана с фосфопантетеиновой группой ацилпереносящего белка.

Димер синтазы жирных кислот ориентирован таким образом, что Домен I одного мономера прилежит к Доменам II и III другого мономера. Поворот «фосфопантетеиновой ручки» позволяет реакции активации протекать на одной субъединице, а остальным реакциям цикла – на другой. Поэтому синтаза ЖК функционально активна только в виде димера.

Механизм синтеза жирных кислот

Для того чтобы синтезировать жирную кислоту, нужно последовательно присоединять к ацетил-СоА двууглеродные единицы. Активным донором таких единиц является малонил-СоА, хотя его малонильный остаток содержит не два, а три углеродных атома. Малонил-СоА образуется из ацетил-СоА в результате присоединения карбоксильной группы. Но прежде чем это произойдет, находящийся в матриксе митохондрий ацетил-СоА должен попасть в цитоплазму, где локализован комплекс синтазы жирных кислот.

Транспорт ацетил-СоА из митохондрий в цитозоль

В матриксе митохондрий основное количество ацетил-СоА образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата, в процессе β-окисления жирных кислот, при расщеплении углеродных скелетов аминокислот. Ацетил-СоА является заряженной молекулой, поэтому он не способен преодолеть внутреннюю мембрану митохондрий. Для транспорта ацетильных групп в цитоплазму существует специальный «челночный механизм». Им является цитрат-малат-пируватный транспортер (рис. 23.3).

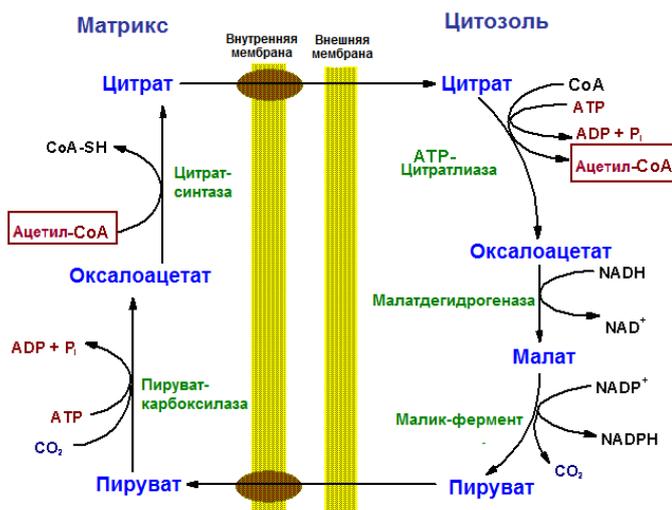


Рис.23.3. Транспорт ацетил-СоА из матрикса митохондрий в цитозоль

С помощью этого «челнока» ацетильные компоненты попадают в цитоплазму в составе цитрата, который при участии АТФ-цитрат-лиазы расщепляется на оксалоацетат и ацетил-СоА. Для реакции необходимы АТФ и HSCoA. Оксалоацетат восстанавливается в малат и таким образом возвращается в матрикс, где регенерируется в цитрат. Часть малата под действием малик-фермента (NADP⁺-зависимой малатдегидрогеназы) подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием пирувата и NADPH. NADPH используется в качестве восстановительного эквивалента в липогенезе. Пируват транспортируется в митохондрии.

Транспорт цитрата из митохондрий в цитозоль происходит при высокой концентрации кислоты. Это наблюдается тогда, когда изоцитратдегидрогеназа ингибируется высокими концентрациями АТФ. При повышении концентрации цитрата в митохондриях начинает работать «челночный механизм» (рис. 23.3) – цитрат поступает в цитозоль. Появление его в цитозоле служит аллостерическим сигналом о том, что цикл лимонной кислоты перегружен топливом и что избыток ацетил-СоА должен запасаться в виде триацилглицеролов.

Образование малонил-СоА

Лимитирующей стадией в биосинтезе ЖК является образование малонил-СоА из ацетил-СоА и бикарбоната. Реакция карбоксилирования осуществляется в цитозоле, катализируется ацетил-СоА- карбоксилазой и требует затраты одной молекулы АТФ. Участвующий в реакции CO_2 образует свободную карбоксильную группу малонил-СоА.

Ацетил-СоА-карбоксилаза – сложный фермент, простетической группой которого служит биотин (рис. 23.4).

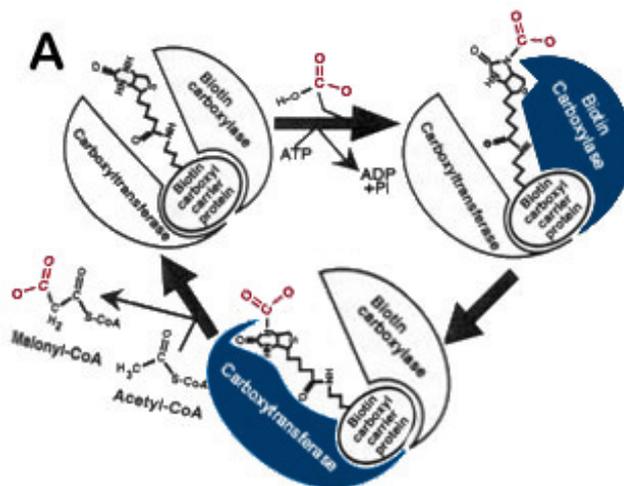


Рис.23.4. Структура ацетил-СоА-карбоксилазы

Образование малонил-СоА происходит в две стадии. На первой стадии биотинкарбоксилаза осуществляет АТФ-зависимое присоединение CO_2 к атому азота биотина; на второй – активированный CO_2 при участии карбоксилтрансферазы переносится с биотина на ацетил-СоА с образованием малонил-СоА (рис.23.4, рис. 23.5).

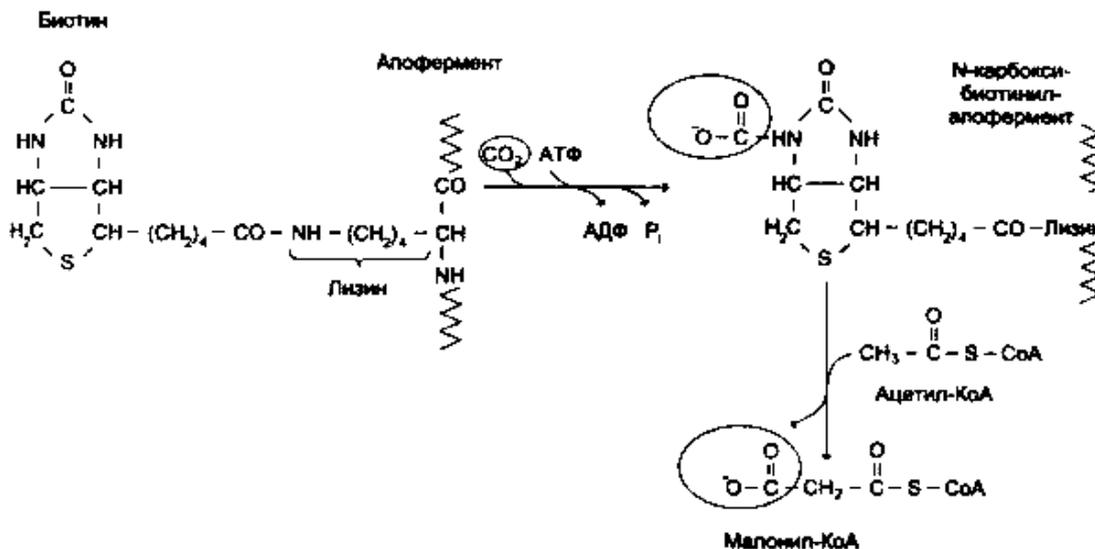


Рис.23.5. Образование малонил-СоА

Ацетил-СоА-карбоксилаза – регуляторный фермент. Катализируемая этим ферментом реакция является лимитирующей стадией всего процесса биосинтеза ЖК в животных тканях. Ацетил-СоА-карбоксилаза существует в малоактивной протомерной и активной форме (нитевидный полимер). Взаимопревращение этих форм и факторы, влияющие на данный процесс, приведены на [рис. 23.6](#).

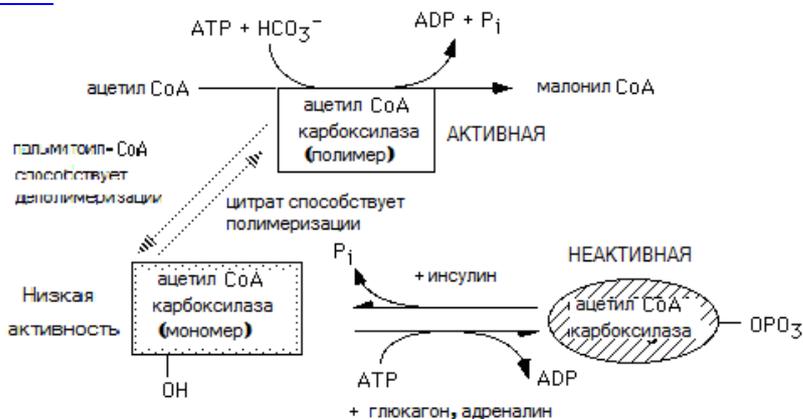


Рис. 23.6. Аллостерическая регуляция и ковалентная модификация ацетил-СоА-карбоксилазы

Положительным аллостерическим эффектором, способствующим образованию полимерной молекулы фермента, служит цитрат, отрицательным \square пальмитоил-СоА. Фосфорилирование ацетил-СоА-карбоксилазы, осуществляемое АМР-зависимой протеинкиназой, ингибирует фермент. Поэтому клетка при низкой величине энергетического заряда (много АМР, мало АТР) не синтезирует жирные кислоты. Глюкагон и адреналин ингибируют синтез ЖК, а инсулин – стимулирует (эти гормоны оказывают противоположный эффект на деградацию ЖК).

Экспрессия синтазы жирных кислот регулируется гормонами. Инсулин стимулирует синтез фермента в печени, а полиеновые жирные кислоты уменьшают транскрипцию гена синтазы жирных кислот. В адипоцитах экспрессия гена синтазы жирных кислот ингибируется лептином, играющим важную роль в регуляции приема пищи и метаболизме жирных кислот.

Наращивание (элонгация) углеродной цепи жирной кислоты

Все стадии синтеза ЖК представляют собой циклический процесс, протекающий на поверхности синтазы ЖК. В синтазе жирных кислот есть две существенные для катализа SH-группы, одна из которых принадлежит 4-фосфопантетеину АПБ, другая – специфическому остатку цистеина в молекуле β -кетоацил-АПБ-синтазы. Для того чтобы начался синтез ЖК, необходимо, чтобы они были нагружены соответствующими ацильными группами. Их загрузка происходит в результате двух последовательных реакций (реакции 1 и 2, см. [рис. 23.7](#)), катализируемых ацетил – и малонилтрансферазой соответственно. После завершения этих реакций с синтазой оказываются ковалентно связанными две ацильные группы: ацетильная, присоединенная к SH-группе цистеина, и малонильная, связанная с SH-группой 4-фосфопантетеина ацилпереносящего белка.

Присоединение каждого двууглеродного фрагмента в процессе наращивания цепи происходит в четыре этапа:

1 этап – конденсация. Ацетильная и малонильная группа конденсируются с образованием ацетоацетильной группы, которая связана с SH-группой АПБ. Одновременно с этим происходит выделение молекулы CO_2 . Катализирует этот процесс β -кетоацил-АПБ-синтаза (реакция 3).

Ацетильная группа становится концевым двууглеродным звеном вновь образованной ацетоацетильной группы. Выделившийся CO_2 – та самая молекула диоксида углерода, которая исходно включилась в молекулу малонил- CoA в ацетил- CoA -карбоксилазной реакции. Таким образом, в ходе биосинтеза ЖК CO_2 не используется для построения ковалентного остова молекулы ЖК, а играет роль катализатора. При отщеплении CO_2 от малонильной группы резко возрастает реакционная способность оставшегося двууглеродного фрагмента и благодаря этому он может быстро взаимодействовать с ацетильной группой.

2 этап – восстановление. Ацетоацетил-АПБ подвергается восстановлению по карбонильной группе с образованием D- β -гидроксибутирил-S-АПБ. Эта реакция катализируется β -кетоацил-АПБ-редуктазой, использующей в качестве восстановителя NADPH (реакция 4).

3 этап – дегидратация. D- β -гидроксибутирил-АПБ дегидратируется под действием β -гидроксиацил-АПБ-дегидратазы с образованием кротонил-S-АПБ (реакция 5).

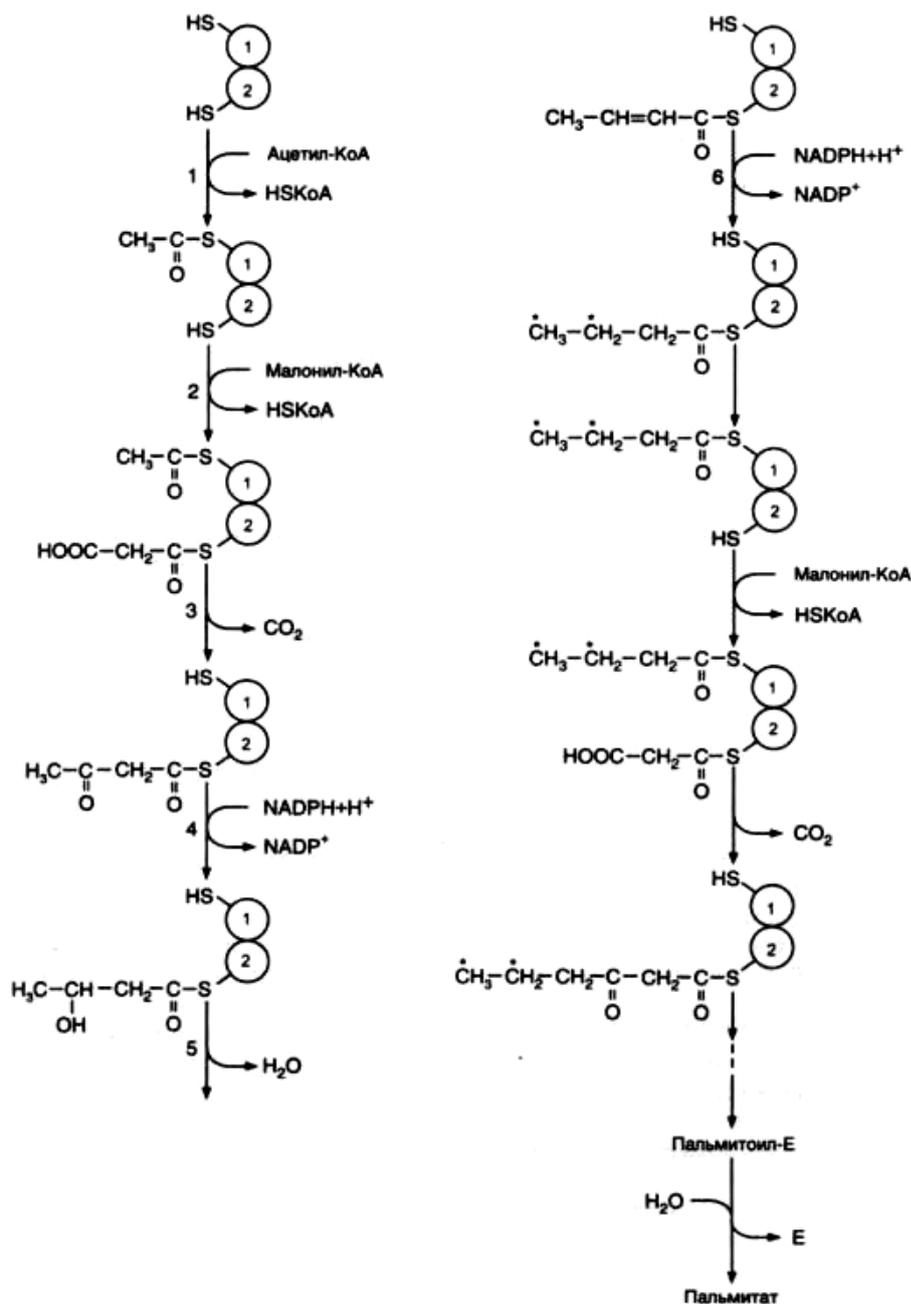


Рис. 23.7. Биосинтез пальмитиновой кислоты (1 – SH-группа β-кетоацил-АПБ-синтазы, 2 – SH-группа 4-фосфопантетеина АПБ)

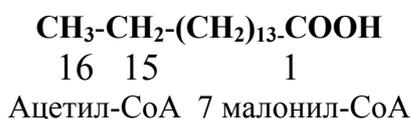
4 этап – восстановление (насыщение). Этот этап завершает один цикл элонгации, осуществляемой комплексом синтазы ЖК. Двойная связь восстанавливается под действием еноил-АПБ-редуктазы (реакция б). Для этого процесса требуется еще одна молекула восстановленного NADP.

Далее происходит перенос бутирильной группы с HS-АПБ на HS-Cys. Вновь образованная удлиненная ацильная группа (бутирильная) занимает положение при той SH-группе, с которой изначально была связана ацетильная группа. Далее бутирильная группа покидает SH-группу Cys и замещает COOH в малонильной группе на HS-АПБ. В результате образуется 6-углеродная ацильная группа, связанная с SH-группой АПБ. В ходе трех следующих циклов элонгации β-кетогруппа образовавшейся ацильной группы

восстанавливается и образуется 6-углеродная насыщенная ацильная группа. Далее C₆-углеродный фрагмент переносится с SH-группы АПБ на SH-группу цистеина.

Для образования конечного продукта – пальмитата – необходимо семь таких циклов. Процесс наращивания цепи заканчивается на шестнадцатом углеродном атоме. Растущий жирнокислотный остаток поочередно связывается с HS-группой АПБ и SH-группой Cys в β-кетоацил-АПБ-синтазе, ни разу не покидая комплекс до тех пор, пока не завершится образование пальмитата. И удлинение цепи, и восстановление кетогруппы происходит тогда, когда субстраты связаны с АПБ. Конечный продукт синтеза ЖК – пальмитоил-АПБ с шестнадцатью углеродными атомами – гидролизуется с освобождением жирной кислоты, которая сразу же взаимодействует с CoA с образованием пальмитоил-CoA.

В конечном счете, все углеродные атомы ЖК образуются из ацетил-CoA, т.к. малонил-CoA, в свою очередь, образуется из ацетил-CoA.



Пальмитат – основной продукт действия синтазы ЖК, однако в небольших количествах образуются и другие ЖК с более короткой или более длинной углеводородной цепочкой.

NADPH, необходимый для биосинтеза ЖК в разных органах поступает из двух источников. В печени он образуется главным образом в пентозофосфатном пути, жировых клетках (адипоцитах) – в цитозоле (преимущественно в двух ферментативных реакциях – NADP-зависимой малатдегидрогеназной (малик-фермент) и NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназной).

Синтез других предельных и непредельных ЖК

Пальмитиновая кислота служит предшественником для синтеза других насыщенных жирных кислот с более длинной цепью в организме животных и человека. Удлинение углеродной цепи может происходить за счет дополнительного присоединения ацетил-CoA (митохондрии) или малонил-CoA (ЭПР) при помощи ферментов, имеющих как в цитозоле (микросомальные ферменты), так и в митохондриях.

На [рис. 23.8](#) приведен процесс наращивания углеродного скелета жирной кислоты, осуществляющийся в митохондриях.

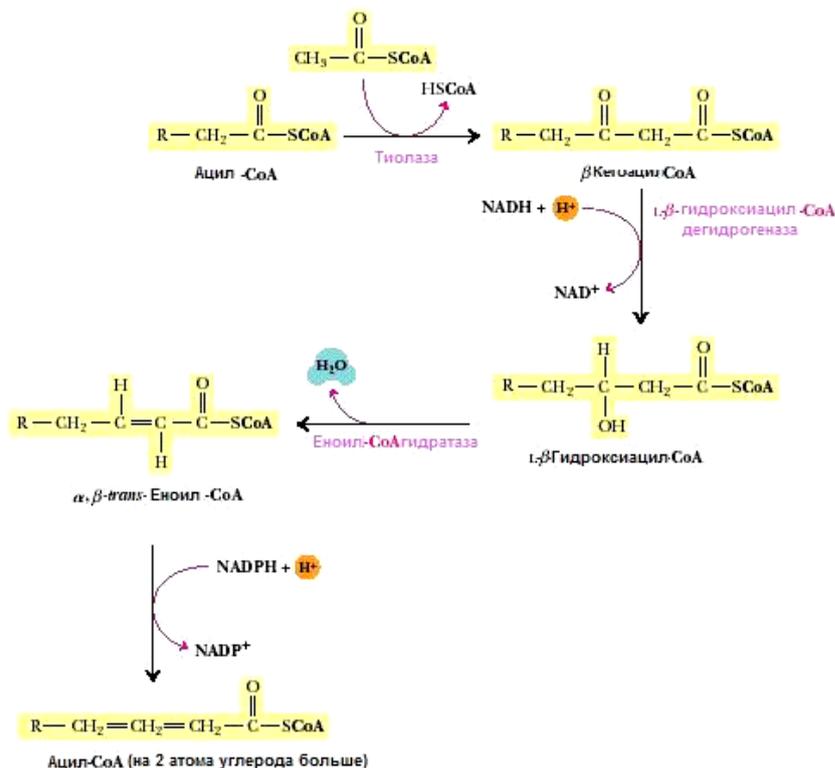


Рис.23.8. Элонгация жирной кислоты в митохондриях

Процесс инициируется тиолазой. β-кетоацильный интермедиат подвергается восстановлению при участии NADH и фермента L-β-гидроксиацил-СoА дегидрогеназы. Далее образовавшийся продукт дегидратируется еноил-СoА-гидратазой (оба фермента являются участниками процесса β-окисления, но работают в обратном порядке). Продукт данных двух энзиматических процессов — интермедиат, содержащий двойную связь (α,β-*транс*-еноил-СoА). Для восстановления двойной связи используется NADPH. В результате образуется ацил-СoА, удлинённый на два атома углерода.

Введение двойных связей осуществляется с помощью ферментов десатураз. Десатуразы (ацил-оксигеназы) могут образовывать двойные связи в пальмитиновой и стеариновой кислотах, в результате образуются моноеновые жирные кислоты — пальмитолеиновая и олеиновая.

Эти процессы осуществляются преимущественно в микросомах в печени и требуют участия молекулярного кислорода, восстановленного NAD и цитохрома b₅ (рис. 23.9).

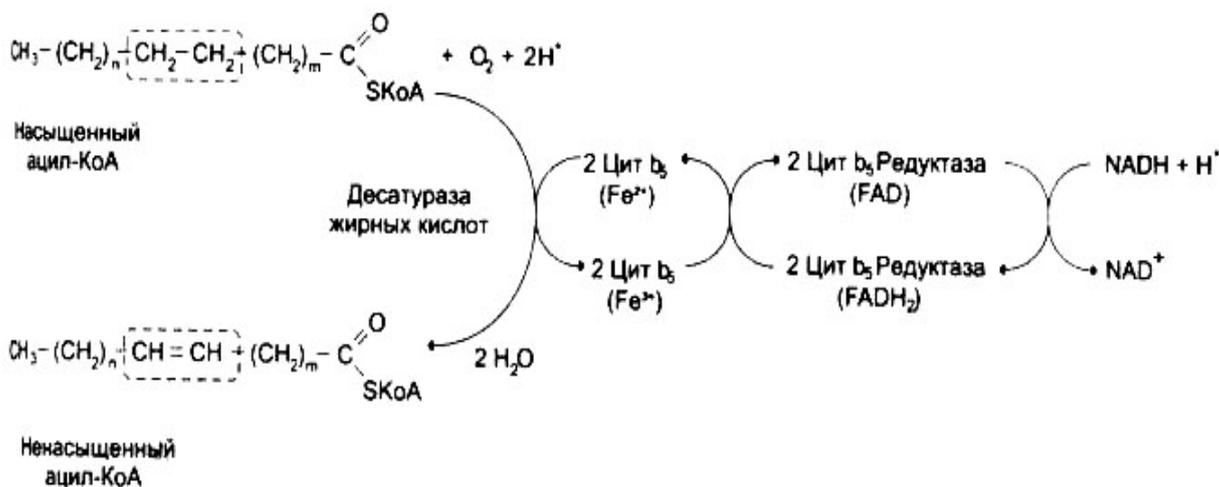


Рис. 23.9. Образование ненасыщенных жирных кислот

В этом процессе одновременно окисляются два разных субстрата: жирная кислота (возникает двойная связь) и NADH. Его катализируют десатуразы, являющиеся монооксигеназами. Известен и другой механизм образования двойных связей в молекулах жирных кислот, не требующий участия молекулярного кислорода. У микроорганизмов (*E.coli*) синтез пальмитолеиновой кислоты начинается еще на синтазе жирных кислот, со стадии образования двойной связи в составе C₁₀-фрагментов особым ферментом, присутствующим в кишечной палочке. Затем происходит удлинение ненасыщенного фрагмента до C₁₆- и C₁₈-производных.

У животных и растений введение в молекулу насыщенной жирной кислоты первой двойной связи осуществляется в цитозоле довольно легко. Образование дополнительных связей у растений происходит в эндоплазматическом ретикулуме. У животных образование двойных связей не может происходить в цепи далее девятого углеродного атома, поэтому млекопитающие и человек не могут образовывать ненасыщенные жирные кислоты с двумя и тремя двойными связями. Эти жирные кислоты относятся к категории незаменимых, или эссенциальных, т.е. должны поступать в организм с пищей (растительного происхождения).

Эти жирные кислоты служат субстратами для построения других полиненасыщенных жирных кислот. Недостаток линолевой и линоленовой кислот в рационе животных приводит к торможению роста, поражению кожных покровов и почек, нарушению функции размножения. На [рис. 23.10](#) приведен процесс превращения линолевой кислоты (две двойные связи) в арахидоновую кислоту, содержащую четыре двойных связи.

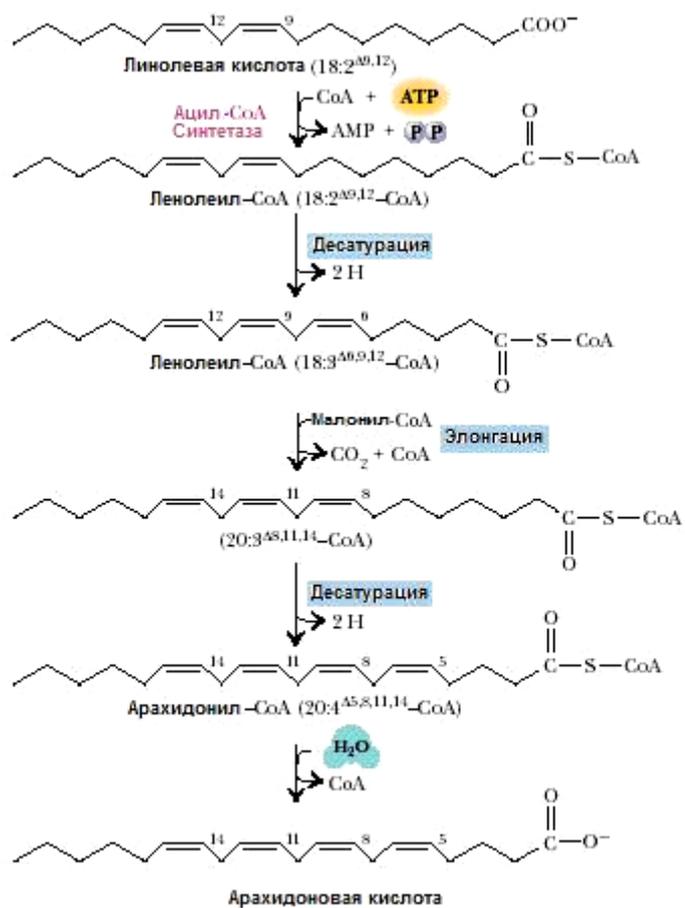


Рис. 23.10 Синтез арахидоновой кислоты у эукариот

Биосинтез триацилглицеролов

Свободные жирные кислоты присутствуют в тканях и плазме крови в небольших количествах и в норме не накапливаются, т.к. используются для синтеза различных липидов и в первую очередь триацилглицеролов. Синтез триацилглицеролов происходит из глицерола и жирных кислот (преимущественно стеариновой, пальмитиновой и олеиновой).

Основными предшественниками для синтеза триацилглицеролов служат активированные жирные кислоты и глицерол-3-фосфат. Глицерол-3-фосфат образуется либо при прямом фосфорилировании за счет АТФ при участии глицеролкиназы, либо при восстановлении промежуточного продукта гликолиза □ дигидроксиацетон-3-фосфата ферментом глицерол-3-фосфатдегидрогеназой ([рис.23.11](#)).

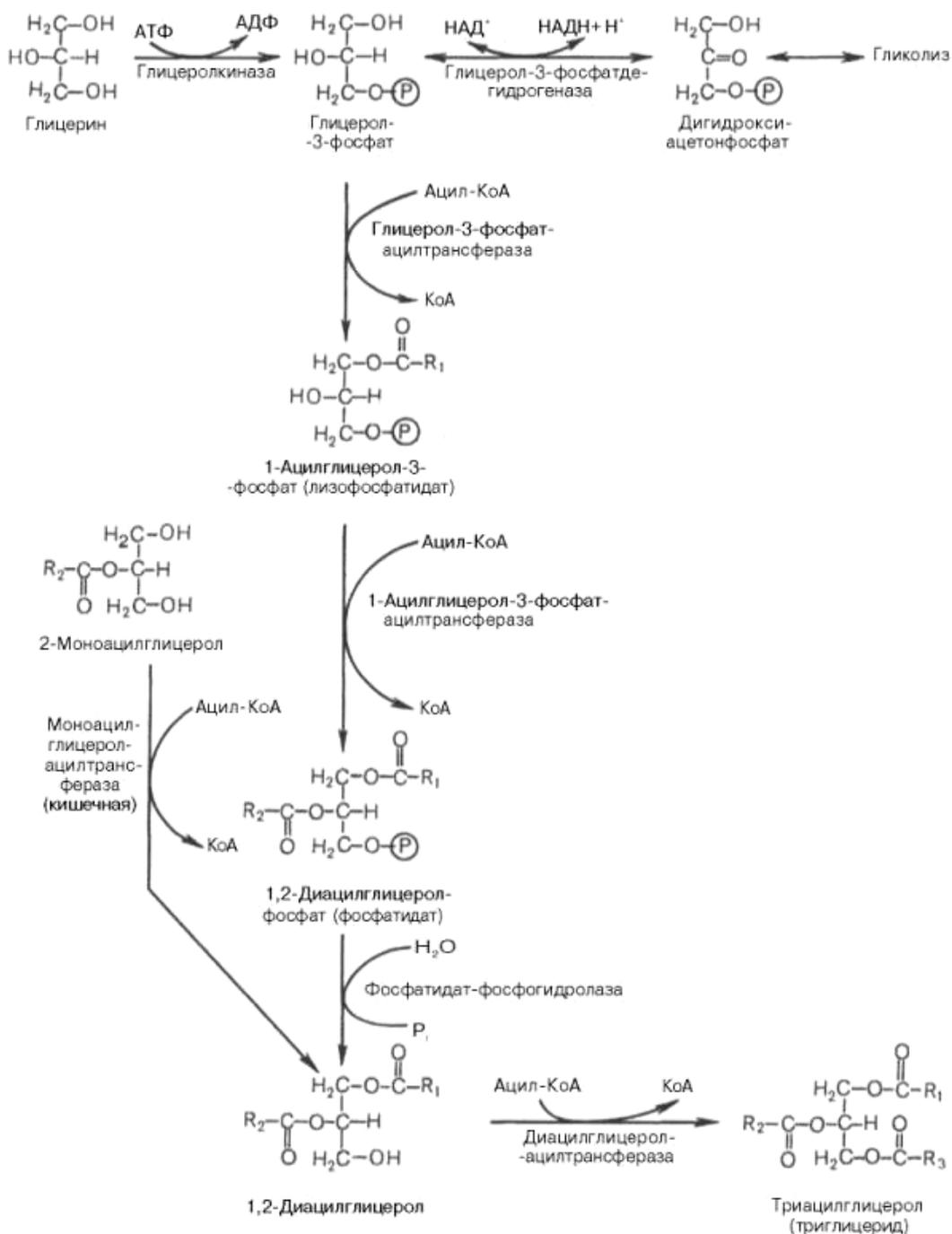


Рис.23.11. Пути биосинтеза триацилглицеролов

В синтезе триацилглицеролов принимают участие ферменты ацилтрансферазами, которые присоединяют ацильные группы от активированных жирных кислот к моноацилглицеролу, либо диацилглицеролу.

Установлено, что большинство ферментов, участвующих в биосинтезе триацилглицеролов, находятся в эндоплазматическом ретикулуме, и только некоторые, например глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза, – в митохондриях.

Лекция 24

Биосинтез холестерина и желчных кислот

Механизм биосинтеза стеролов долгое время оставался неясным, хотя существовали доказательства беспрепятственного синтеза стеролов у большинства органических форм (исключение составляют насекомые). Сложный процесс биосинтеза стеролов, основные этапы которого совпадают у самых разных организмов, был расшифрован с помощью метода меченых атомов.

Чуть меньше чем половина холестерина (ХС) в организме человека образуется при биосинтезе *de novo*. Биосинтез в печени составляет приблизительно 80%, в тонком кишечнике синтезируется приблизительно 15%, в коже – порядка 5% от количества, продуцируемого ежедневно стерола. Схема синтеза холестерина приведена на [рис.24.1](#). Промежуточные продукты (геранилпирофосфат, фарнезилпирофосфат) могут использоваться для синтеза долихола, коэнзима Q, боковой цепи гема *a*, а также для посттрансляционной модификации белков (пренилированные белки). Помимо этого, в печени из холестерина образуются желчные кислоты, а в эндокринных железах стероидные гормоны.

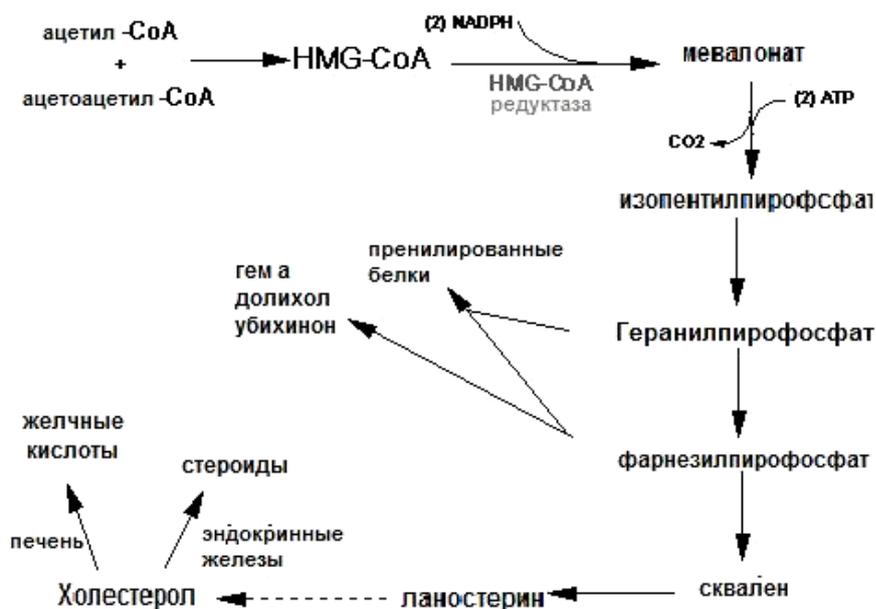


Рис.24.1. Общая схема биосинтеза стеролов

Биосинтез холестерина

Синтез ХС происходит в цитоплазме и микросомах. Исходным веществом для синтеза стеролов является ацетил-CoA, который транспортируется из митохондрий в цитоплазму (транспорт ацетил-CoA рассмотрен ранее, в лекции 23). 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуказная (ГМГ-CoA редуктаза) реакция – первая, практически необратимая реакция в цепи биосинтеза ХС.

Она протекает со значительной потерей свободной энергии. Установлено, что данная реакция лимитирует скорость биосинтеза холестерина.

Реакции фосфорилирования требуются для сольubilизации изопреноидных интермедиатов данного пути.

Биосинтез холестерина осуществляется в несколько этапов. I этап (рис. 24.2) включает образование 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (ГМГ-CoA) из ацетил-CoA и превращение ГМГ-CoA в мевалонат. В результате двух последовательно протекающих реакций (тиолазной и гидроксиметилглутарил-CoA-синтазной) из трех молекул ацетил-CoA образуется одна молекула 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA.

Следующая реакция – превращение ГМГ-CoA в мевалонат. Она катализируется ГМГ-CoA редуктазой. Процесс восстановления требует затраты двух молекул NADPH. Источником NADPH является пентозофосфатный путь окисления глюкозы, а также NADP⁺-зависимые цитозольные малатдегидрогеназная и изоцитратдегидрогеназная реакции.

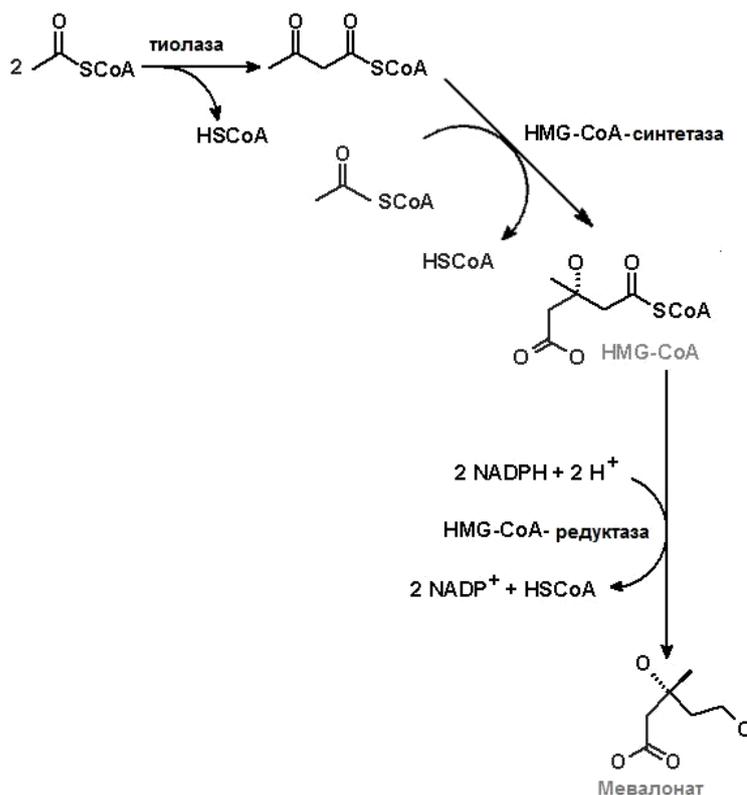


Рис.24.2. Первый этап биосинтеза холестерина

II этап (рис. 24.3) – превращение мевалоната в фарнезилпирофосфат. Мевалонат дважды подвергается фосфорилированию по 5-ОН-группе при участии киназ. Донором фосфатных групп в этих реакциях служит АТФ. Пирофосфомевалонат подвергается декарбоксилированию и дегидратированию, превращаясь в изопентенилпирофосфат (ИПФ, C₅). Изопентенилпирофосфат

□ активная изопреноидная единица, широко распространенная в природе и

участвующая не только в синтезе ХС, но в синтезе каротиноидов, боковых цепей убихинонов, витаминов К и Е.

ИПФ изомеризуется в диметилаллилпирофосфат (ДПФ, C₅). Взаимодействие ИПФ с молекулой диметилаллилпирофосфата, катализируемое изопентенилтрансферазой, приводит к образованию геранилпирофосфата (C₁₀). Изопентенилтрансфераза осуществляет перенос диметилаллильного радикала на раскрывающуюся двойную связь в молекуле ИПФ. При этом происходит миграция двойной связи и потеря одной молекулы пирофосфата.

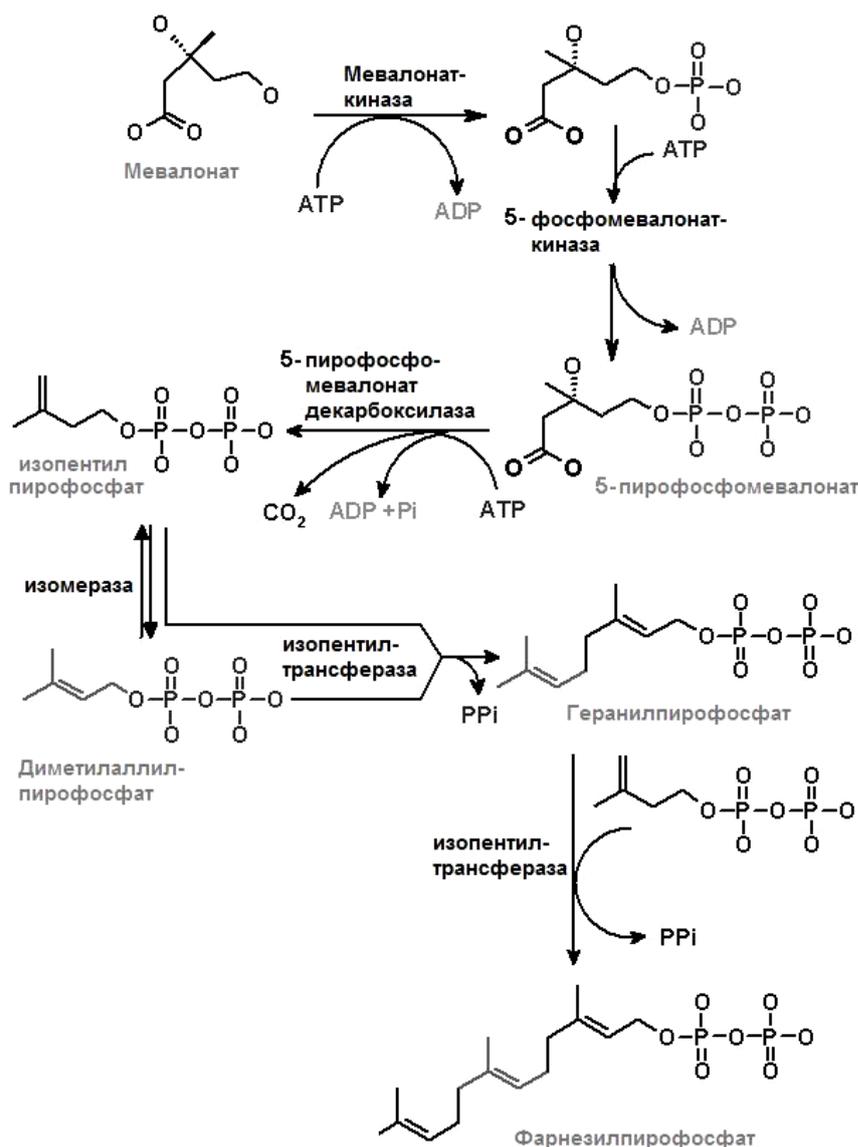


Рис. 24.3. Превращение мевалоната в фарнезилпирофосфат

К геранилпирофосфату вновь присоединяется ИПФ, в результате образуется фарнезилпирофосфат (C₁₅) и освобождается пирофосфат, получающий атом водорода от близлежащей метиленовой группы. Эта конденсация является NADPH-зависимым процессом.

Этот же фермент катализирует реакцию переноса радикала геранила от геранилпирофосфата к следующей молекуле ИПФ. Освобождающийся в этой

и в предыдущей реакции пирофосфат гидролизуется неорганической пирофосфатазой, что обеспечивает необратимость биосинтетического процесса. Продуктом данного этапа биосинтеза холестерина служит фарнезилпирофосфат (C₁₅).

III этап (рис. 24.4, рис. 24.5) □ образование сквалена из фарнезилпирофосфата и превращение сквалена в ланостерол.

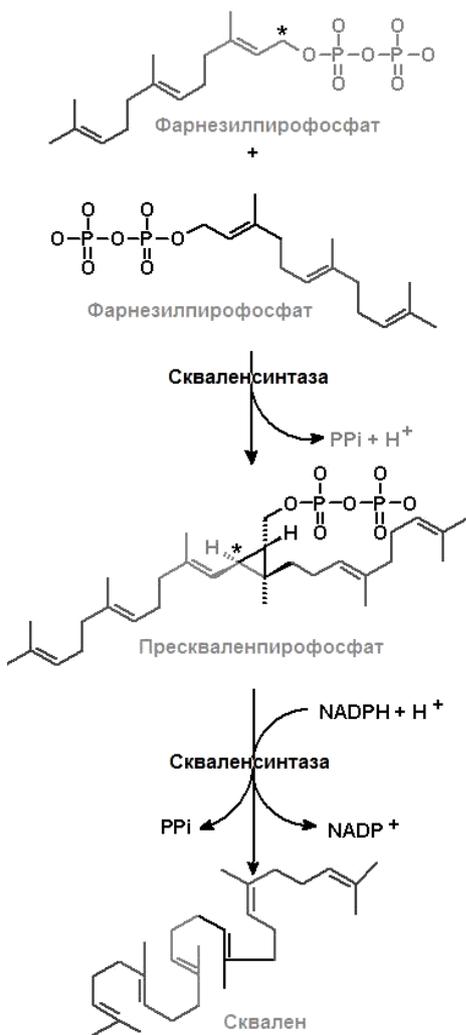


Рис.24.4. Образование сквалена

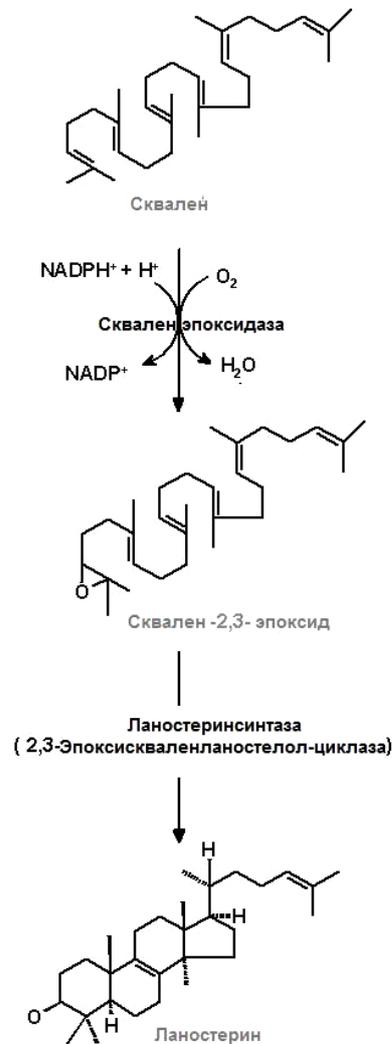


Рис.24.5. Превращение сквалена в ланостерол

Две молекулы фарнезилпирофосфата, соединяясь «голова к голове» и теряя каждая свой пирофосфат, образуют сквален, содержащий 30 атомов углерода. Сквален образуется из прескваленилпирофосфата под действием фермента скваленилсинтазы, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме. Источником атомов водорода в этой реакции является NADPH.

Сквален □ непредельный углеводород, состоящий из шести изопреноидных единиц (C₃₀). Молекула сквалена легко принимает пространственную конфигурацию, близкую к пространственной конфигурации стеролов.

На стадии образования сквалена завершается анаэробная фаза биосинтеза ХС. Последующая фаза биосинтеза ХС является аэробной. На первом

этапе при участии сквален-эпоксидазы, являющейся монооксигеназой, сквален легко окисляется с образованием сквален-2,3-эпоксида.

Ланостерол-синтаза осуществляет замыкание шести \square и пятичленных циклов в результате протонирования эпоксидной группы и смещения электронной плотности в системе двойных связей сквалена. По такому пути протекает образование ланостерола в клетках печени. У растений и других организмов в циклизации сквален-2,3-эпоксида принимают участие другие циклизующие ферментные системы с образованием продуктов иных, нежели ланостерол. Ланостерол уже имеет гидроксильную группу в положении 3 и три лишние по сравнению с ХС метильные группы. Они окисляются до карбоксильных, которые затем удаляются декарбоксилированием.

IV этап ([рис.24.6](#)) – превращение ланостерола в холестерол. Преобразование ланостерола \square многоступенчатый процесс, в ходе которого образуются разнообразные индивидуальные стеролы (зимостерол, десмостерол), характерные для животного и растительного мира.

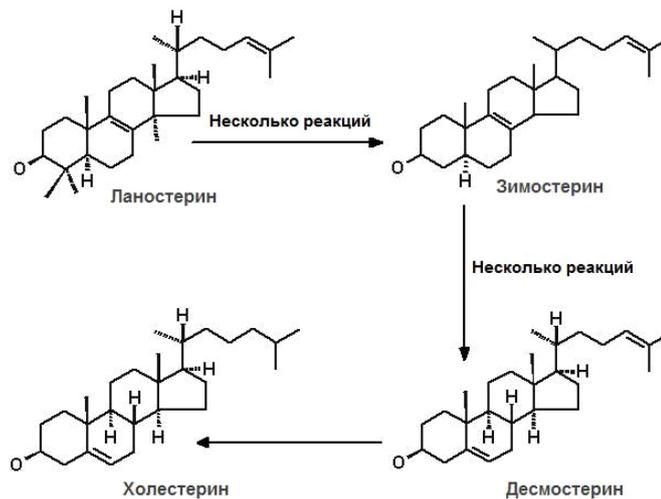
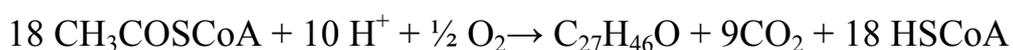


Рис.24.6. Трансформация ланостерола в холестерол

Хотя ланостерол и похож по структуре на холестерол, для его превращения в ХС требуется 20 дополнительных реакций. Ферменты, ответственные за эту трансформацию, локализованы в ЭПР. Преобразование ланостерола в ХС может идти двумя путями. Один из них \square восстановление десмостерола (приведен на [рис. 24.6](#)). Другой путь включает образование 7-дегидрохолестерола как предпоследнего интермедиата при синтезе холестерина.

Независимо от заключительного пути преобразования ланостерола, суммарный итог всех реакций биосинтеза ХС выглядит следующим образом:



Источником углеродного скелета холестерина служит ацетил-СоА, донором водорода являются вода и NADPH. Начиная со сквалена и заканчивая холестерином, все промежуточные продукты биосинтеза нерастворимы в водной среде. Поэтому они участвуют в конечных реакциях биосинтеза ХС, будучи связанными со стеринпереносящими белками. Это обеспечивает их растворимость в цитозоле клетки и протекание соответствующих реакций. Стеринпереносящие белки обеспечивают также перемещение ХС внутри клетки, что имеет важное значение для вхождения его в клеточные мембраны, окисления в желчные кислоты, превращения в стероидные гормоны.

Эфиры холестерина □ принципиальная форма циркулирующего ХС □ образуются на цитоплазматической стороне ЭПР.

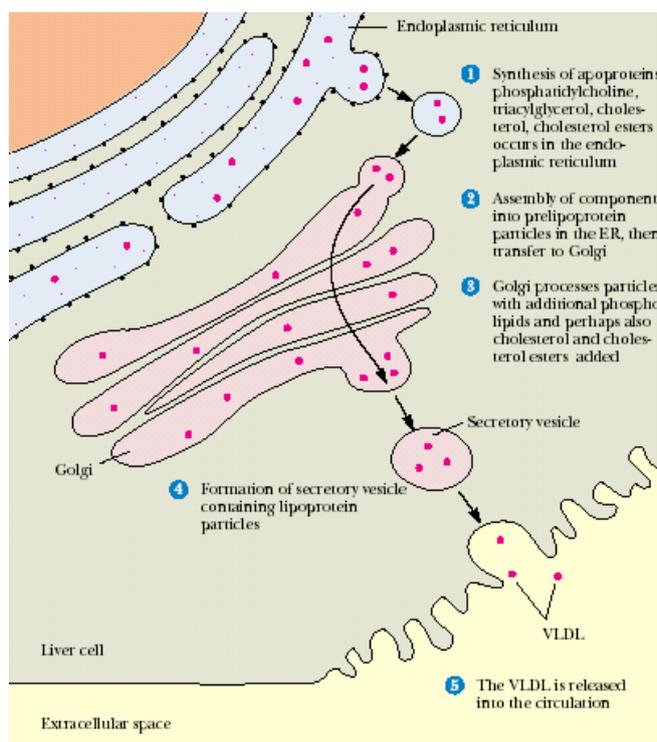


Рис. 24.7. Синтез ХС и его эфиров в эндоплазматическом ретикулуме

Биосинтез стеридов протекает путем переноса остатка высшей жирной кислоты от молекулы ацил-СоА на место водорода ОН-группы стерола. Катализирует этот процесс холестерол-ацилтрансфераза. Источником ацильных групп при биосинтезе стеридов могут выступать глицерофосфолипиды, в частности фосфатидилхолин. Он участвует в образовании эфиров холестерина лимфы и плазмы крови у человека при участии фосфатидилхолин-холестерол-ацилтрансферазы.

Регуляция биосинтеза ХС

Скорость синтеза ХС регулируется по принципу отрицательной обратной связи. Основным пунктом регуляции □ синтез мевалоновой кислоты ГМГ-

CoA редуктазой. Холестерол подавляет ее синтез. При содержании 2-3 г холестерина в суточной пище человека синтез собственного ХС почти полностью прекращается.

Предполагается, что ХС или продукты его окисления в клетке могут угнетать непосредственно синтез редуктазы или индуцировать синтез ферментов, участвующих в ее деградации. При этом тормозится восстановление ГМГ-СоА в мевалоновую кислоту и синтез ХС в целом.

Скорость синтеза ГМГ-СоА редуктазы в печени подвергается четким суточным колебаниям. Максимум ее приходится на полночь, минимум \square на утренние часы. Активность ГМГ-СоА редуктазы возрастает при введении инсулина и тиреоидных гормонов. Угнетение активности фермента наблюдается при голодании, введении глюкагона и глюкокортикоидов.

Биосинтез желчных кислот

Желчные кислоты синтезируются в печени из холестерина. Синтез желчных кислот является доминирующим механизмом для удаления избытка холестерина. Сначала синтезируется из ХС холевая кислота; затем она подвергается АТФ-зависимому активированию, превращаясь в холил-СоА ([рис. 24.8](#)). Далее холил-СоА взаимодействует с таурином и глицином, образуя таурохолевую и гликохолевую кислоту.

Стадией, лимитирующей скорость образования желчных кислот, является реакция, катализируемая 7α -гидроксилазой. Холестерол в этой реакции требует участия электрон-транспортной системы, включающей цитохром P-450 и NADPH-цитохром P-450-редуктазу. Регулирующим фактором является концентрация желчных кислот, циркулирующих с желчью: чем выше их концентрация, тем ниже активность 7α -гидроксилазы, и наоборот.

Роль 7α -гидроксилазной реакции в образовании желчных кислот по значению сопоставима с ГМГ-СоА-редуктазной реакцией в биосинтезе холестерина.

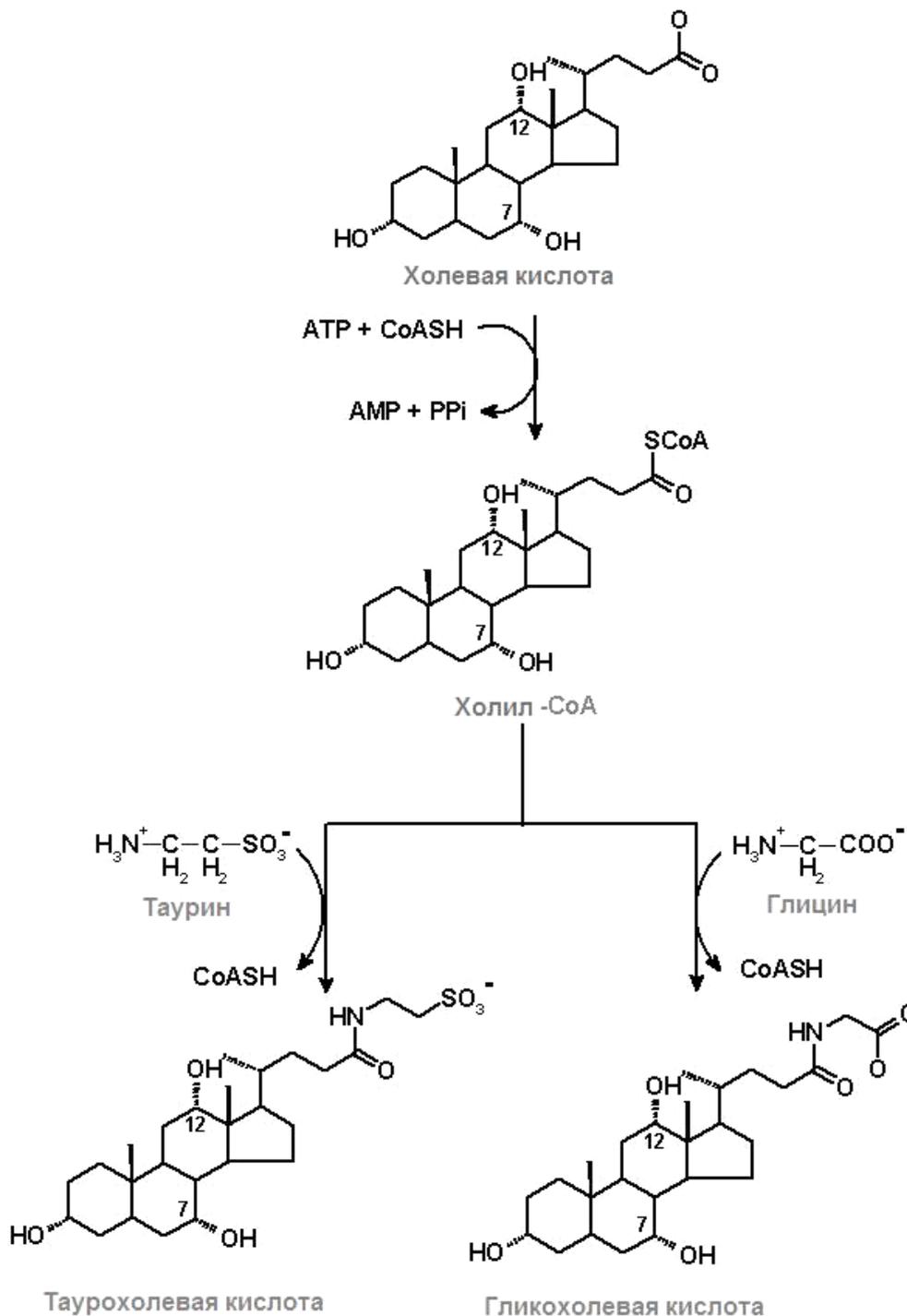


Рис.24.8. Образование таурохолевой и гликохолевой желчных кислот

Доказано, что активность этих ферментов изменяется параллельно, и т.к. как большая часть синтезируемого в печени холестерина (до 75%) идет на образование желчных кислот, часто бывает трудно определить, связано ли угнетение их образования с подавлением ГМГ-СоА-редуктазы или 7 α -гидроксилазы.

Лекция 25

Биологическое окисление

Роль высокоэнергетических фосфатов в биоэнергетике. Биологическая роль АТФ. Свободная энергия гидролиза АТФ и других органических фосфатов

Для описания состояния химической системы используют понятие *свободной энергии Гиббса*, которое ввели Гиббс и Гельмгольц, объединив 1-й и 2-й законы термодинамики: $\Delta G = \Delta E - T\Delta S$. Определение «свободная» означает свободу использовать энергию для совершения полезной работы. Свободная энергия ΔG количественно характеризует потенциальную способность вещества претерпевать химические и физические превращения. Химическая реакция протекает лишь в том случае, если $\Delta G < 0$, т.е. в условиях, когда свободная энергия продуктов реакции меньше, чем свободная энергия исходных веществ. В химических процессах ΔG зависит не только от характера реакции, но и от тех условий, в которых она протекает.

Все содержащиеся в клетке фосфорилированные соединения разделяют на две группы: *высокоэнергетические* и *низкоэнергетические* (в зависимости от величины ΔG^0 их гидролиза). Высокоэнергетические фосфаты выполняют в клетке функцию аккумуляции биологической энергии и ее последующего использования для выполнения клеточных функций. К таким фосфатам относятся креатинфосфат ($\Delta G^0 = -14,80$ ккал), фосфоенолпируват ($\Delta G^0 = -11,80$ ккал), карбамоилфосфат. Изменение стандартной свободной энергии гидролиза АТФ при $t=37^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 7,0$ в присутствии избытка Mg^{2+} составляет $-7,3$ ккал/моль.

АТФ в термодинамической шкале занимает промежуточное положение. Этим объясняется уникальность молекулы АТФ и ее биологическая роль посредника при переносе фосфатных групп от высокоэнергетических фосфорилированных соединений к акцепторным молекулам. Запас АТФ в клетке может обеспечить энергией работу клетки лишь на несколько секунд. Цикл АТФ-ADP работает постоянно и производит такое количество АТФ, которое было израсходовано клеткой. За сутки в организме человека образуется и распадается около 60 кг АТФ. Энергия химических связей АТФ используется в организме для совершения полезной работы. На всех этапах превращения энергии, в том числе и при гидролизе АТФ, часть энергии выделяется в виде тепла.

Высвобождение большого количества энергии при гидролизе АТФ объясняется структурными особенностями этой молекулы: 1) молекулы АТФ при $\text{pH}=7,0$ имеют в среднем около 3,8 отрицательных заряда. Эти заряды располагаются близко друг от друга и потому между ними – сильное отталкивание. При гидролитическом отщеплении концевой фосфатной группы сила отталкивания уменьшается. Образовавшиеся продукты (анионы HPO_4^{2-} и ADP^{3-}) не стремятся к объединению, потому что их сближению препятствует отталки-

вание одноименных зарядов. 2) продукты гидролиза, HPO_4^{2-} и ADP^{3-} стабилизируются за счет сопряжения. Электроны, окружающие атомы фосфора и кислорода концевой фосфатной связи АТФ, конкурируют за энергетически выгодные орбитали. Наличие такой конкуренции не позволяет всем электронам концевой пиррофосфатной связи занять столь низкие энергетические уровни, какие они способны занять в отдаленных друг от друга ионах HPO_4^{2-} и ADP^{3-} .

Биологическое окисление. Ферменты, участвующие в биологическом окислении

Биологическое окисление – совокупность реакций окисления субстратов в живых клетках, основная функция которых – энергетическое обеспечение метаболизма. Другими словами, *биологическое окисление* – процесс, в котором субстраты теряют протоны и электроны, а промежуточные переносчики – акцепторы и доноры протонов и электронов (NAD^+ , NADH , FAD , FADH_2 , FMN , FMNH_2 , цитохромы, убихинон и т.п.) – переносят их (при аэробном окислении) на кислород. При анаэробном окислении в качестве акцепторов выступают другие соединения. Таким образом, процесс окисления – это химические реакции переноса электронов от окисляемого вещества (донора) к восстанавливаемому (акцептору). В ходе реакций биологического окисления высокоэнергетические электроны, находящиеся в молекулах углеводов и других биомолекул, скатываются на уровень с наименьшей энергией и связываются с кислородом. Энергия, отдаваемая ими при этом, используется для образования макроэргических фосфатных связей. Поток электронов, движущихся по ступеням процесса биологического окисления, – слабый электрический ток.

В реакциях окисления перенос электронов происходит в соответствии с их «электронным сродством». Способность молекулы принимать электроны оценивается по величине *окислительно-восстановительного потенциала* (E). Отрицательная величина E означает низкое сродство, положительная – высокое сродство. В процессе окисления перенос электронов происходит по направлению от более отрицательного к более положительному потенциалу. При отрицательном значении E электроны являются «высокоэнергетическими». При переходе к системе с более высоким значением E они теряют часть своей энергии и способны произвести работу. Энергия, освобождающаяся при переносе электронов между двумя системами, прямо связана с разностью окислительно-восстановительных потенциалов между ними:

$$-\Delta G = \Delta E'_0 n F,$$

где ΔG – изменения свободной энергии реакции окисления (кДж/мин), $\Delta E'_0$ – разность потенциалов между окислительно-восстановительными системами (в), n – масса перенесенных электронов (моль), F – число Фарадея (96463 Дж/в).

Основной путь использования энергии, освобождающейся при биологическом окислении, — накопление её в молекулах АТФ и других макроэнергетических соединений. Химическая энергия, аккумулированная в макроэнергетических фосфатных связях при окислении питательных веществ, используется организмом для осуществления различных биологических функций.

Существует два типа окисления

Свободное окисление не сопряжено с фосфорилированием АДФ и не сопровождается трансформацией энергии, выделяющейся при окислении, в энергию макроэнергетических связей. При свободном окислении энергия, высвобождающаяся при сопряженном с окислением распаде химических связей энергия переходит в тепловую и рассеивается. По типу свободного окисления идут все без исключения оксигеназные реакции, все окислительные реакции, ускоряемые пероксидазами или сопровождающиеся образованием H_2O_2 , а также многие реакции, катализируемые оксидазами. Процессы свободного окисления сосредоточены в цитозоле, мембранах эндоплазматического ретикулума, лизосом, пероксисом и аппарата Гольджи, на внешних мембранах митохондрий и хлоропластов. Они идут также в ядерном аппарате клетки.

Окисление, сопряженное с фосфорилированием АДФ, — тип биологического окисления, которое может осуществляться двумя способами. Если макроэнергетическая связь возникает в момент непосредственного окисления субстрата, а затем передается на фосфатный остаток, который, в свою очередь, используется для фосфорилирования АДФ, такой вид биологического окисления называют окислением, сопряженным с фосфорилированием АДФ на уровне субстрата (*субстратным фосфорилированием*). Если атомы водорода с коферментов дегидрогеназ, принимающих участие в окислении субстратов, передаются в оксидоредуктазную цепь, где сопряженно с переносом протонов и электронов на молекулярный кислород происходит активирование неорганического фосфата и при его посредстве фосфорилирование АДФ с образованием АТФ, то такое сопряжение окисления с синтезом АТФ называется сопряжением на уровне электронтранспортной цепи (*окислительным фосфорилированием*). В этом случае сам окисляемый субстрат непосредственного участия в активировании неорганического фосфата не принимает.

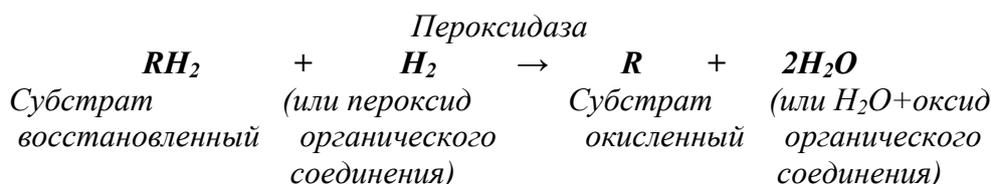
Сопряжение окисления с фосфорилированием идет на внутренних мембранах митохондрий. Здесь осуществляется сопряжение окисления с фосфорилированием на уровне электронтранспортной цепи.

Реакции биологического окисления в клетках катализируют класс *оксидоредуктаз — окислительно-восстановительных ферментов*.

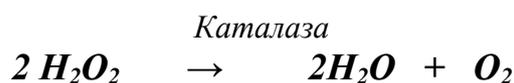
При биологическом окислении может осуществляться прямое взаимодействие молекулы биоорганического субстрата с кислородом:



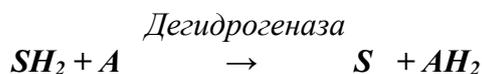
Ферменты, катализирующие этот тип окислительных реакций, называются *оксидазами*. На первом этапе биологического окисления образуются *пероксиды*. Молекула кислорода при этом переводится в активированное состояние за счет разрыва двойной связи в ней при посредстве «внутренней колебательной энергии» самого окисляемого вещества, обладающего кратной связью, и при участии ферментов – оксидаз. Возникшие пероксиды органических соединений, как и пероксид водорода, могут окислять другие вещества при каталитическом воздействии *пероксидазы*:



Пероксид водорода может распадаться и иным путем, т.е. при участии фермента *каталазы*:



Реакции, связанные с отщеплением водорода от молекулы биоорганического субстрата (дегидрогенирование):



В ходе реакций, которые катализируются *дегидрогеназами*, водород, отщепляемый от субстрата, переходит на молекулу акцептора, переводя ее в восстановленное состояние. В последующем, через ряд промежуточных превращений, водород может передаваться на конечный акцептор – кислород. В зависимости от строения коферментов дегидрогеназы делятся на две группы, т.е. NAD-зависимые и FAD-зависимые:

а) в NAD-зависимых дегидрогеназах NAD непрочен связан с апоферментом, в восстановленной форме (NADH) он отделяется от апофермента и служит донором водорода для следующего акцептора;

б) в FAD-зависимых дегидрогеназах FAD ковалентно связан с апоферментом.

Диоксигеназы – ферменты, ускоряющие включение двух атомов молекулярного кислорода в окисляемый субстрат. Одной из наиболее важных диоксигеназных реакций является превращение β-каротина в витамин А.

Монооксигеназы – ферменты, ускоряющие включение одного атома молекулярного кислорода в окисляемый субстрат. Монооксигеназы принимают участие в окислении аминокислот (лизин-, аргинин-, триптофанмоноксигеназы, фенилаланин-, тирозингидроксилаза), окислитель (салицилатгидроксилаза), полиизопреноидных соединений (скавален-эпоксидаза).

Решающую роль в функционировании монооксигеназ и диоксигеназ играют металлы, входящие в состав фермента.

Свободное окисление и его биологическая роль. Цитохром P-450

Если энергия окислительной реакции выделяется исключительно в виде тепла, то это *свободное окисление*. В энергетическом обеспечении функциональной активности клетки свободное окисление играет вспомогательную роль: оно служит для *производства тепла и детоксикации вредных продуктов обмена веществ и ксенобиотиков*.

Микросомальная система окисления

Микросомальная система окисления эндогенных органических соединений и ксенобиотиков представляет собой полиферментный комплекс цепей переноса электронов, зависимый от NADPH и NADH. Общим звеном системы является *цитохром P-450*. В состав этого комплекса входят *цитохром b₅*, *NADPH-цитохром P-450-редуктаза*, *NADH-цитохром b₅-редуктаза*:



NADPH и NADH являются донорами электронов для процессов гликозилирования, осуществляемых цитохромами *b₅* и P-450. FP₁ и FP₂ являются переносчиками электронов, флавопротеинами. FP₁ представляет собой NADPH-цитохром P-450-редуктазу, а FP₂ является NADPH-цитохром b₅-редуктазой. С FP₁ и FP₂ возможен перенос электронов на цитохром *c* — основной компонент дыхательной цепи митохондрий. В результате осуществляется межмембранный перенос электронов.

Наиболее важной реакцией микросомального окисления является гидроксилирование, сущность которого заключается во внедрении одного атома активированного кислорода в окисляемое вещество, в то время как другой его атом идет на образование воды. Таким образом, гидроксилирование протекает по монооксигеназному типу: SH — окисляемый субстрат, NADPH — донор электронов, SOH — гидроксилированный продукт. Превращение атомов кислорода в молекулу воды и гидроксильную группу осуществляет цитохром P-450. В некоторых клетках эта система включает еще дополнительный промежуточный переносчик электронов между редуктазой и цитохромом P-450.

Цитохром P-450 представляет собой комплекс белка с гемом (фосфолипидпротоген-сульфидпротеиновый комплекс). Этот гемопротеин получил свое название в связи с тем, что в восстановленной форме, присоединяя CO,

он образует спектральный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 450 нм. По высоте этого пика поглощения определяют его содержание в исследуемых образцах. В эндоплазматической сети гепатоцитов имеется много изоформ Р-450 с молекулярной массой 45-55 кДа. Цитохром Р-450 – гидрофобный белок, локализованный внутри мембраны. Простетическая группа (протопорфирин IX содержит Fe^{3+}) помещается в гидрофобной полости, активном центре цитохрома Р-450. Чем больше цитохрома Р-450 находится в мембране, тем она в лучшем состоянии. Стареющие мембраны имеют цитохром Р-420 (неактивная форма). Цитохром Р-448 отличается от цитохрома Р-450 последовательностью аминокислот и формой взаимодействия гема с белком. Цитохром Р-448 является терминальной оксидазой в системе гидроксилаз, обеспечивающих метаболизм циклических углеводов. Наличие многих изоформ позволяет монооксигеназным системам осуществлять биотрансформацию разных липотропных ксенобиотиков.

Цитохром b_5 представляет собой гемопротейн с молекулярной массой 11-13 кДа, содержит 1 моль Fe^{3+} протопорфирина IX на 1 моль апофермента. В окисленной форме цитохром b_5 обладает максимумом поглощения при 412-426 нм. В отличие от Р-450, b_5 локализован на поверхности эндоплазматического ретикулума. Функционально они тесно связаны и могут образовывать сложные гемопротейновые комплексы, повышая скорость катализируемых реакций.

Механизм гидроксирования

Существует несколько схем действия микросомальных оксигеназ. Наиболее распространенной является схема, в которой выделяют 5 стадий: 1) связывание окисленной формы цитохрома Р-450 с субстратом ($\text{Fe}^{3+}\text{-S}$); 2) восстановление образовавшегося комплекса в NADPH-специфичной цепи переноса электронов ($\text{Fe}^{2+}\text{-S}$); 3) образование тройного комплекса: восстановленная форма Р-450- S-O_2 ; 4) активирование молекулярного кислорода в этом комплексе путем восстановления $\text{Fe}^{2+}\text{-S-O}_2^-$; 5) распад комплекса на окисленный цитохром Р-450, окисленный субстрат и гидроксил S-OH.

Лекция 26

Субстратное и окислительное фосфорилирование. Дыхательная цепь

Окисление, сопряжённое с фосфорилированием ADP. Окислительно-восстановительные потенциалы дыхательных переносчиков. Субстратное фосфорилирование на примере реакций, катализируемых глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и енолазой. Понятие энергетического заряда клетки.

Окисление, сопряженное с синтезом АТФ, называется *сопряженным окислением*, которое может осуществляться двумя путями: на *уровне субстрата* и на *уровне электронтранспортной цепи*.

В ходе реакций окисления электроны, находящиеся на высокоэнергетическом уровне в молекуле восстановителя (водорода), переходят на низкоэнергетическую орбиталь в молекуле окислителя, где они сильнее притягиваются ядрами атомов. Способность молекулы принимать электроны оценивается по величине окислительно-восстановительного потенциала (E). Отрицательная величина E обозначает низкое сродство, положительная – высокое сродство. В биологии используется стандартный E'_0 (нормальный потенциал), определяемый при параметрах 25°C , 1 моль/л, 1 атм, $\text{pH}=7,0$. В процессе окисления перенос электронов происходит по направлению от более отрицательного к более положительному потенциалу (рис. 26.1).

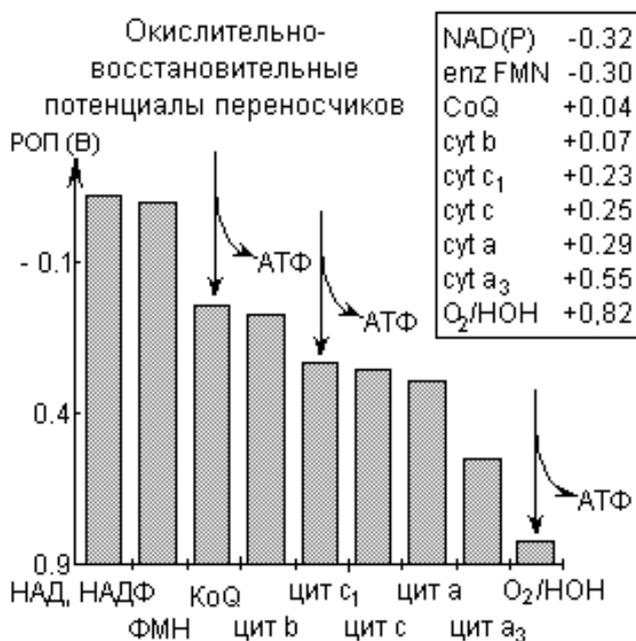
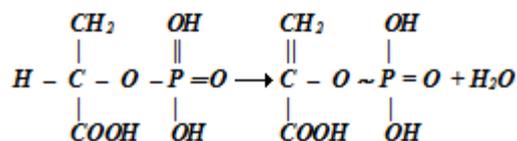


Рис.26.1. Окислительно-восстановительные потенциалы электронтранспортной цепи

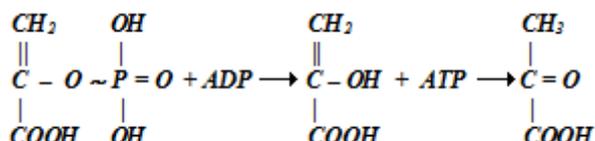
Электроны при отрицательном значении потенциала являются «высокоэнергетическими» и при переходе к системе с более высоким значением потенциала они теряют часть своей энергии и способны произвести работу.

Примером сопряженного окисления на уровне субстрата могут служить реакции окисления 3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицерат, 2-фосфоглицерата – в 2-фосфоенолпируват (реакции гликолиза). С возникающих в ходе этих реакций соединений фосфат, связанный макроэргической связью, легко передается на ADP. Однако посредством реакций субстратного фосфорилирования образуется сравнительно небольшое количество АТФ.

Наиболее прост механизм образования АТФ при окислении 2-фосфоглицерата. Эта реакция, катализируемая енолазой, представляет собой внутримолекулярное окисление, в результате которого образуется богатое энергией фосфорное соединение – фосфоенолпируват:

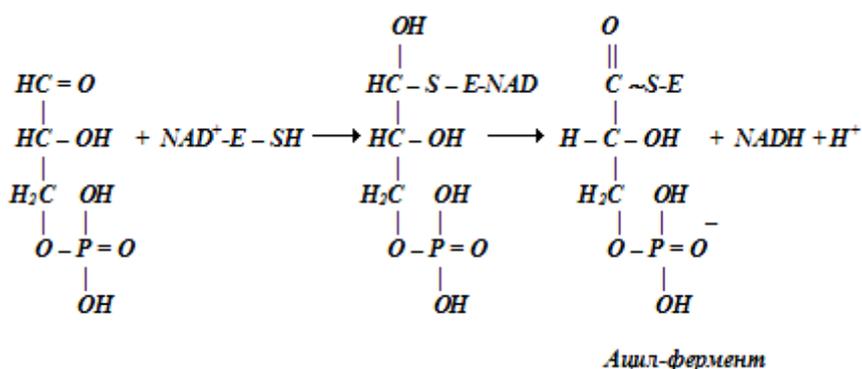


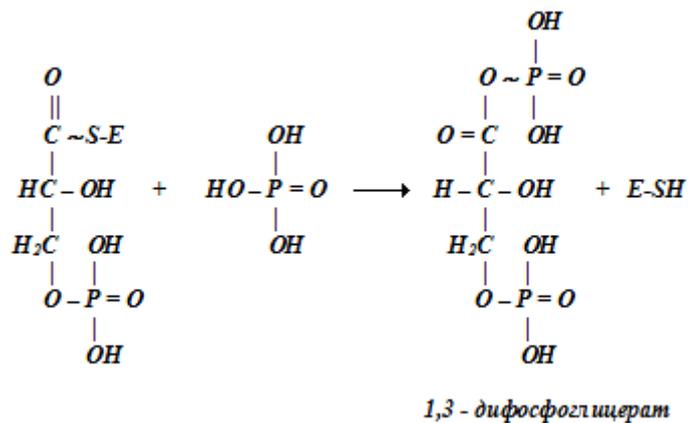
Окисление ведет к уменьшению плотности электронов на атоме фосфора в молекуле фосфоенолпирувата. Это придает фосфорильному остатку способность взаимодействовать с молекулой ADP, что приводит к синтезу АТР:



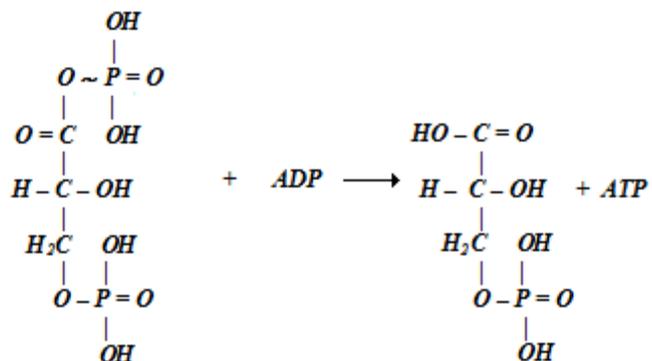
В соответствии со схемой химического сопряжения в этой реакции функции донора электронов, акцептора электронов и акцептора энергии окисления выполняют различные атомарные группировки в молекуле одного и того же вещества – 2-фосфоглицерата. В роли первичного макроэргического соединения, аккумулирующего энергию окисления, выступает один из продуктов реакции – фосфоенолпируват.

Фосфорилирование при анаэробном окислении глицеральдегид-3-фосфата происходит более сложным путем. Окисление субстрата является результатом взаимодействия с комплексом фермент-NAD. Вначале альдегид-ферментный комплекс окисляется до ацилфермента, а затем под действием неорганического фосфата тиоловый эфир расщепляется с образованием макроэргического соединения □ 1,3-дифосфоглицерата:





В последующем под действием фермента фосфоглицераткиназы макроэргическая фосфатная группа этого соединения переносится на ADP с образованием АТФ:



В роли донора электронов в этой реакции выступает глицеральдегид-3-фосфат, вступающий в соединение с ферментом. Роль акцептора электронов выполняет NAD^+ , в качестве компонента сопряжения выступает SH-группа фермента, первичное высокоэнергетическое соединение представлено ацил-ферментом.

Энергетическое состояние клетки можно оценить с помощью энергетического заряда. Согласно Аткинсону, энергетическое состояние клетки лучше всего может быть охарактеризовано степенью «заполнения» системы АТФ-ADP-AMP высокоэнергетическими фосфатными связями. Если все содержащиеся в клетке аденозинфосфаты находятся в форме АТФ, это означает, что система энергетически заполнена до предела, т.е. ее энергетический заряд равен 1,0. Другому предельному состоянию соответствует случай, когда все содержащиеся в клетке аденозинфосфаты находятся в форме AMP. В этом случае система не содержит высокоэнергетических связей, т.е. она энергетически «пуста» и ее энергетический заряд равен 0. Если все аденозинфосфаты находятся в форме ADP или эквимолярной смеси АТФ и AMP, это значит, что система заполнена высокоэнергетическими связями наполовину, т.е. ее энергетический заряд равен 0,5. Энергетический заряд системы АТФ, ADP,

AMP можно легко вычислить для любого соотношения концентраций АТР, АДР и АМР при помощи уравнения

$$\text{Энергетический заряд} = \frac{1}{2} \frac{[ADP] + 2[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

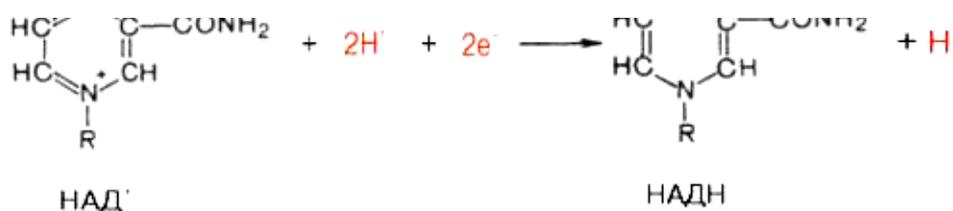
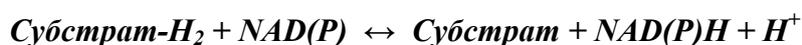
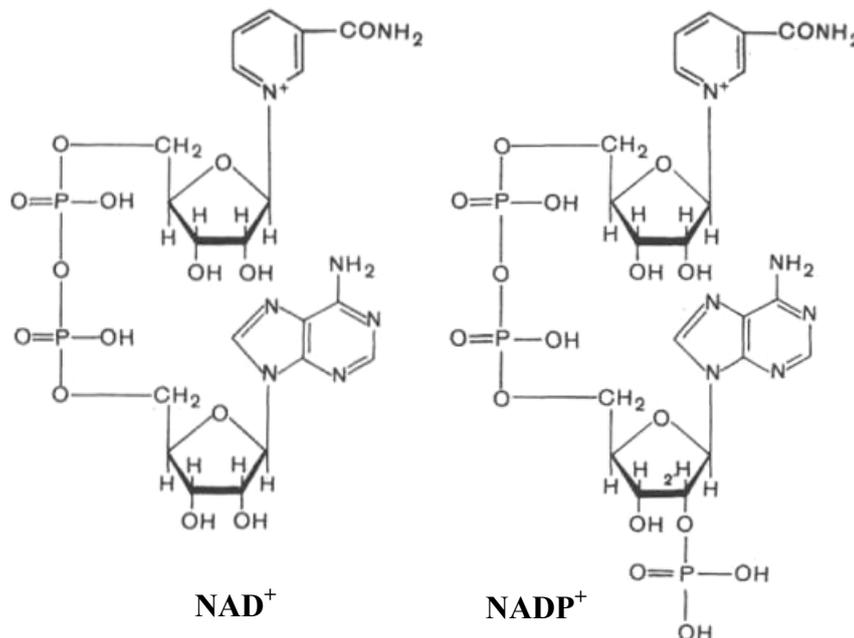
Цепь переноса электронов и протонов внутренней мембраны митохондрий (дыхательная цепь, редокс-цепь). Компоненты дыхательной цепи: флавопротеины, железосерные белки, коэнзим Q, цитохромы b, c₁, c, aa₃. Топография дыхательных переносчиков в редокс-цепи

Последовательность реакций, связанных с переносом водорода на кислород при участии специфических переносчиков электронов, называется дыхательной (или электронтранспортной) цепью. У животных и человека она составлена из четырех основных типов переносчиков, каждый из которых способен претерпевать обратимое окисление и восстановление в результате потери и присоединения электронов при взаимодействии с другим переносчиком.

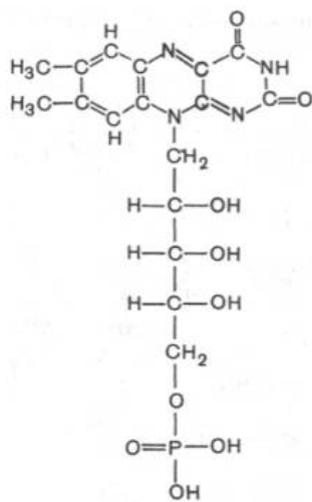
Первый тип переносчиков электронов в дыхательной цепи представлен никотинамидными коферментами – NAD⁺ и NADP⁺. Они способны активировать водород, отщепляемый от различных органических субстратов, действуя в составе дегидрогеназного окислительно-восстановительного ферментного комплекса. Коферменты NAD⁺ и NADP⁺ способны связываться с различными носителями, и каждый такой комплекс служит специфическим катализатором только в одной определенной реакции. Специфичность связывания коферментов NAD⁺ и NADP⁺ с ферментными белками зависит от аденин-нуклеотидной части их молекул, в то время как никотинамидная часть молекул этих коферментов придает им уникальное свойство действовать в качестве переносчиков электронов и протонов. В реакциях дегидрирования два атома водорода отщепляются от молекулы субстрата. Один атом водорода и один электрон переносятся на никотинамидное кольцо с образованием восстановленной формы коферментов NAD⁺ и NADP⁺ (NADH и NADPH), а другой атом водорода, потерявший электрон [H⁺], освобождается в окружающую среду.

Дегидрогеназные реакции с участием коферментов NAD⁺ и NADP⁺ имеют ряд уникальных свойств, которые обуславливают их ключевую роль в процессах биологического окисления. Первая особенность – легкая обратимость при небольших изменениях свободной энергии, что позволяет коферментам участвовать как в окислении субстрата, так и в восстановлении продуктов реакции (в зависимости от потребностей клетки). Вторая особенность заключается в способности этих коферментов (как в окисленной, так и в восстановленной форме) легко отделяться от белка-носителя, в их высокой подвижности, что облегчает обмен атомами водорода и электронами между раз-

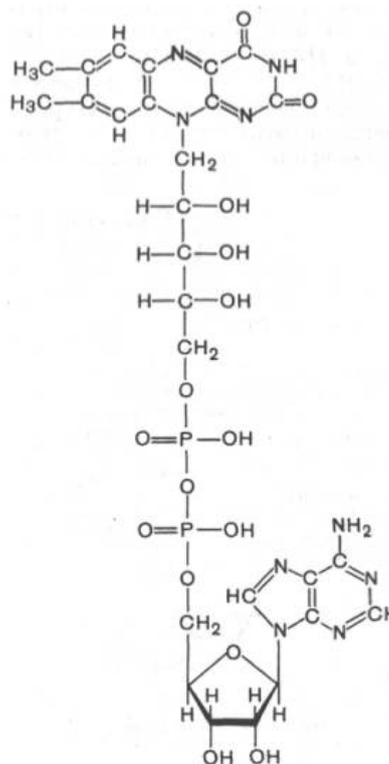
личными дегидрогеназными системами, расположенными в разных частях клетки. Коферменты NAD^+ и NADP^+ способны акцептировать водород от большого числа субстратов, окислительно-восстановительный потенциал которых ниже $-0,3 \text{ В}$. К числу таких субстратов относятся продукты расщепления углеводов, жиров и различных аминокислот.



Второй тип переносчиков электронов, действующих в дыхательной цепи, — это флавиновые коферменты: флавинмононуклеотид (FMN) и флавинадениндинуклеотид (FAD). В составе специфических дегидрогеназ (флавиновых ферментов или флавопротеинов) они выполняют роль простетической группы, участвующей в переносе электронов. Активной частью молекулы FAD или FMN служит изоаллоксазиновое кольцо рибофлавина, к атомам азота которого могут присоединяться два атома водорода за счет внутримолекулярной перегруппировки двойных связей:



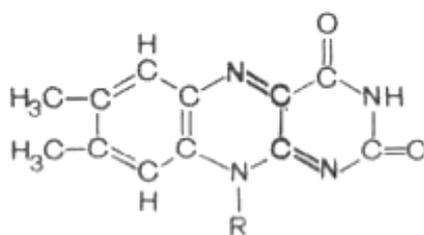
FMN



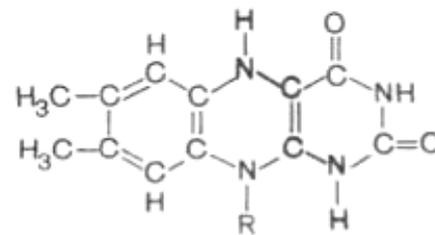
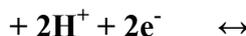
FAD

FMN и FAD прочно связаны с соответствующими дегидрогеназными белками и не могут свободно переносить восстановительные эквиваленты путем диффузии к другим дегидрогеназным системам. Реакции, катализируемые флавинозависимыми дегидрогеназами, труднообратимы, и, следовательно, флавиновые коферменты не могут служить источником водородных эквивалентов в процессах восстановительного биосинтеза.

В соответствии с относительно низкими окислительно-восстановительными потенциалами (около $\square 0,1$ В) флавопротеины могут акцептировать водород от NADH. При окислении янтарной кислоты, α -глицерофосфата и CoA-производных жирных кислот флавинозависимые ферменты могут играть роль первичных дегидрогеназ и непосредственно принимать электроны и протоны от окисляемых субстратов без участия NAD и связанных с ним дегидрогеназ:

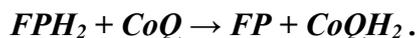


FAD
(FMN)



FADH₂
(FMNH₂)

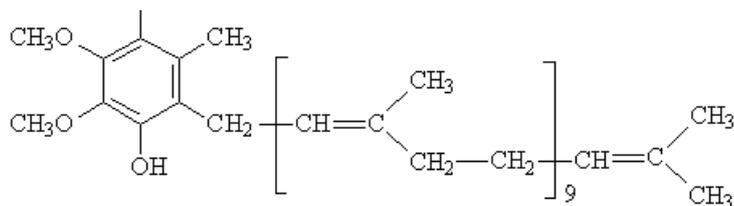
Третий тип переносчиков электронов в дыхательной цепи представлен бензохиноновым соединением, носящим название кофермента Q, или убихинона. При восстановлении он присоединяет два электрона и два протона, образуя гидрохиноновую форму CoQH₂. Система CoQ/CoQH₂ имеет величину E₀, лишь немногим более положительную, чем у флавопротеинов, которые поэтому могут передать свои восстанавливающие эквиваленты на хинон:



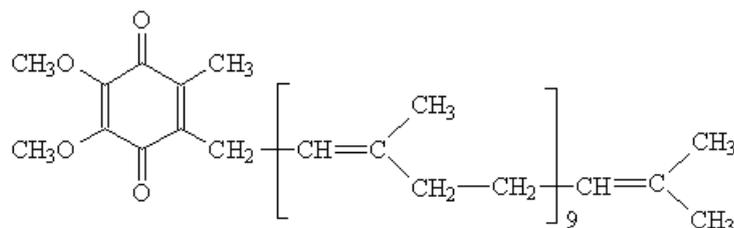
CoQ способен принимать водород от различных флавопротеинов. Система CoQ представляет собой узловой пункт, куда стекается водород, поступающий в дыхательную цепь от самых различных субстратов. Поэтому CoQ в дыхательной цепи представлен в более высоких концентрациях, чем большинство других переносчиков электронов. Хорошая растворимость в липидной фазе мембранных образований и относительно небольшой молекулярный вес придают CoQ свойство подвижного переносчика, взаимодействующего с фиксированными электронпереносящими белками.

Четвертый тип переносчиков электронов в дыхательной цепи от CoQ на кислород представлен группой различных гемсодержащих белков (гемопропротеинов), называемых цитохромами. Отличаясь друг от друга структурой белкового компонента, все они имеют простетическую геминую группу, по строению близкую к гему гемоглобина. В центре порфиринового кольца каждого гема находится ион железа. Гем цитохрома *a* отличается от простетических групп цитохромов *b* и *c* наличием формильного остатка, замещающего метильную группу. Цитохромы переносят электроны последовательно от CoQ на конечный акцептор – кислород. На участке NADH и CoQ осуществляется двухэлектронный перенос, цитохромы переносят по одному электрону. При этом происходит обратимое окисление-восстановление атома железа простетической группы, переходящего из Fe²⁺ в Fe³⁺. Следовательно, на данном участке цепи должны действовать две молекулы цитохромов.

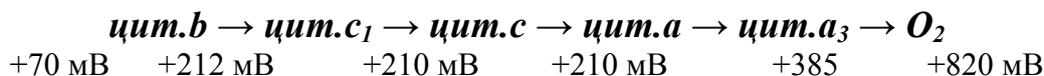
Убихинон восстановленный CoQH_2



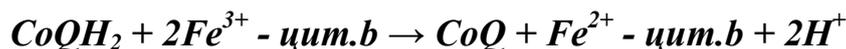
Убихинон окисленный CoQ



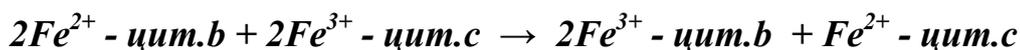
В соответствии с величиной окислительно-восстановительного потенциала у разных цитохромов, они располагаются в определенной последовательности в дыхательной цепи между CoQ и кислородом (здесь и далее цит. – цитохром):



Первой реакцией на этом участке является перенос электронов от CoQH_2 на цитохром *b*, имеющий наиболее низкую величину E'_0 .



В этой реакции для акцептирования двух электронов от восстановленного CoQ требуется 2 моля цитохрома *b* и два протона, которые могут быть перенесены через систему цитохромов и освобождены в окружающую среду. Окислительно-восстановительные пары CoQ/CoQH_2 и Fe^{2+} - цит. *b*, Fe^{3+} - цит. *b* имеет близкие значения величины E'_0 , и эти реакции происходят при небольших изменениях энергии. Восстановленная форма цит. *b* имеют меньшую величину E'_0 , что позволяет ей действовать в качестве восстановителя для следующих переносчиков в дыхательной цепи, а именно цитохрома *c*:



Цитохром c_1 , близкий по величине E'_0 к цитохрому *c*, участвует в этой реакции в качестве промежуточного переносчика электрона между цитохромами *b* и *c*. Завершающей является реакция, катализируемая ферментом цитохромоксидазой – сложным гемопротеином, состоящим из 7 полипептид-

ных цепей, двух различных гемов (цитохромы *a* и *a₃*), и двух атомов меди, принимающих участие в транспорте электронов:



Первый из цитохромов на этом участке – цитохром *a* – реагирует с цитохромом *c*, принимает электроны и переносит их на цитохром *a₃*, который способен прямо взаимодействовать с кислородом как конечным акцептором электронов:



«Активный» кислород присоединяет два протона из окружающей среды, образуя воду. В этой реакции кислород, как наиболее сильный окислитель, акцептируя электроны, создает основную движущую силу для переноса электронов вдоль дыхательной цепи, в результате чего все выше расположенные переносчики поддерживаются в окисленном состоянии и оказываются способными принимать водород и электроны, поставляемые от окисляемых субстратов.

В транспорте электронов принимают участие белки (ферредоксины), содержащие негемовое железо, в молекуле которых железо связывается с белком-носителем через атом серы.

Отличительная особенность FeS-белков – строение их активного центра, содержащего негемовое железо, связанное нековалентными связями с кислотолabileй серой и серой, входящей в состав цистеиновых остатков пептидной цепи. Разные типы железосероцентров (FeS-центры) широко распространены в клетках. Простейший из них содержит один атом железа, нековалентно связанного в молекуле белка и получившего название рубредоксина, с четырьмя остатками цистеина ([рис. 26.2](#)).

Рубредоксин имеет окислительно-восстановительный потенциал около -57 мВ и участвует в реакциях одноэлектронного переноса. Остальные FeS-белки имеют более сложноорганизованные FeS-центры, в состав которых входит неорганическая кислотолabileй сера. Известны Fe₂S₂-центры (содержат по два атома железа и неорганической серы), Fe₃S₃- и Fe₄S₄-центры. FeS-белки могут содержать один или более центров в молекуле. В зависимости от особенностей строения FeS-центров ферредоксины могут одновременно переносить один или два электрона. Окислительно-восстановительный потенциал ферредоксинов находится в диапазоне от -490 до -310 мВ.

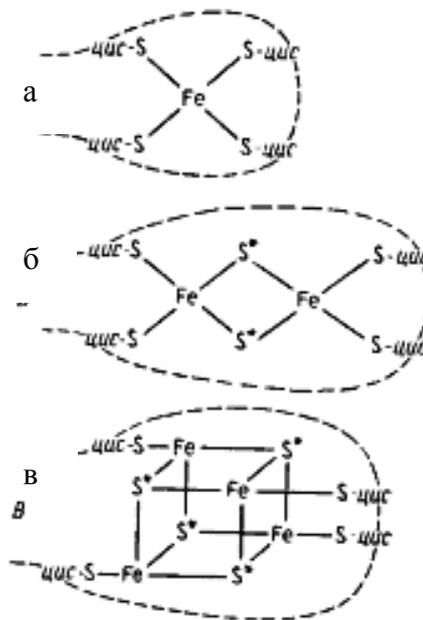


Рис.26.2. Железосерные центры FeS-белков. А □ железосерный центр рубредокси-на; б – железосерный центр Fe₂S₂-типа; в – железосерный центр Fe₄S₄-типа

Все компоненты дыхательной цепи локализируются на внутренней мембране митохондрий и включены в состав белковых комплексов. Активные центры NADH-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы находятся на мембране, со стороны матрикса, как и центр для O₂ на цитохроме *a₃*. Цитохром *c* находится на наружной стороне мембраны, убихинон – в липидной фазе мембраны. Комплекс F₁-F₀ расположен на внутренней стороне мембраны и ориентирован внутрь матрикса (рис. 26.3).

Энергетическое значение ступенчатого транспорта электронов от окисляемых субстратов к молекулярному кислороду. Окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи

Реакции прямого взаимодействия между кислородом и водородом в небиологических условиях сопровождаются взрывообразным выделением энергии в виде тепла и света. Многоступенчатый характер окислительных процессов в живой клетке обеспечивает постепенное освобождение энергии, которая может быть в дальнейшем использована в реакциях, связанных с выполнением различных видов биологической работы. Постепенное освобождение энергии уменьшает ее рассеивание и предохраняет клетку от разрушительного влияния тепловой энергии, которая при непосредственном взаимодействии окисляемого субстрата с кислородом освободилась бы одномоментно. Выработка тепла – это второстепенная функция процесса биологического окисления, основная функция биологического окисления заключается в обеспечении энергией процессов роста, анаболизма, транспорта веществ через мембраны, создания электрических потенциалов, механической работы и т.д.

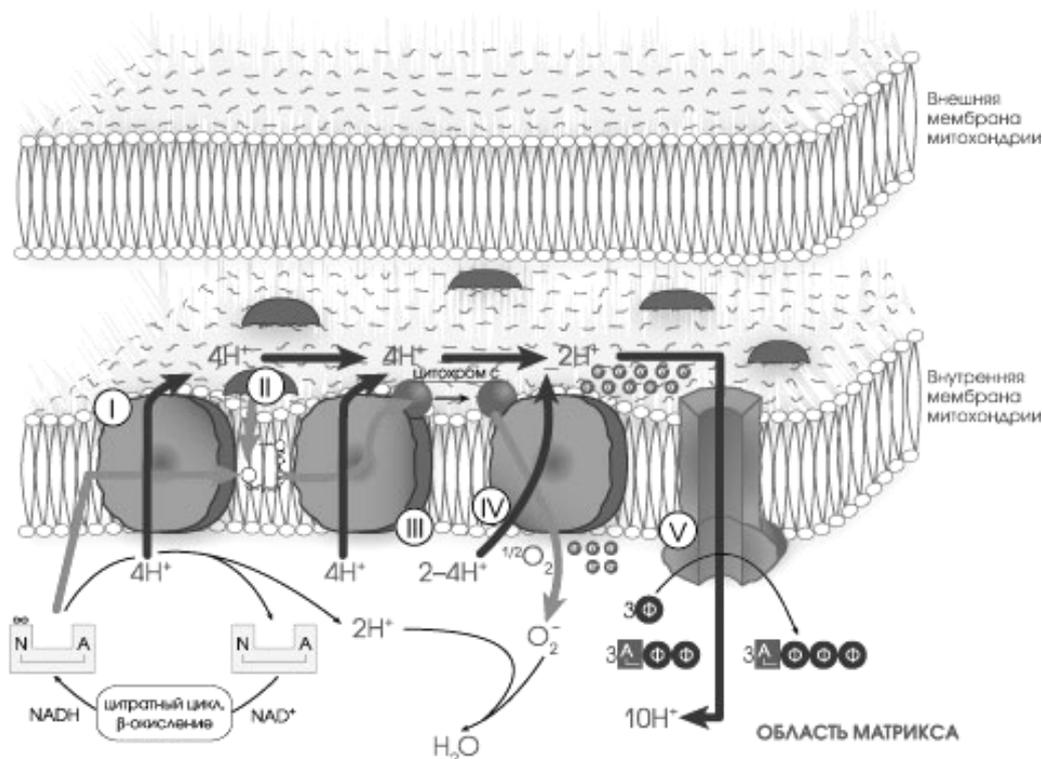


Рис. 26.3. Строение электронтранспортной (дыхательной) цепи митохондрий. I – NADH-дегидрогеназа; II – сукцинатдегидрогеназа; III – цитохромы bc_1 , IV – цитохром-оксидаза

Синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 за счет энергии, выделяющейся при тканевом дыхании, называется *окислительным фосфорилированием*. Сопряжение процессов окисления, служащих источником энергии, и фосфорилирования осуществляется в дыхательной цепи специальными механизмами, способными улавливать и переносить энергию потока высокоэнергетических электронов.

Митохондрии осуществляют важнейшую для клеточной биоэнергетики реакцию фосфорилирования АДФ с образованием АТФ за счет энергии окисления органических соединений, служащих субстратами окисления, молекулярным кислородом. Конечная стадия этого процесса – перенос электронов от восстановленных пиридиннуклеотидов и сукцината на молекулярный кислород – осуществляется по системе переносчиков электрона. При переносе электронов по дыхательной цепи происходит высвобождение энергии, величина которой (в электрон-вольтах) равна разности стандартных восстановительных потенциалов двух реагирующих редокс пар. Энергия одного моля иона в данной среде называется электрохимическим потенциалом. Разность электрохимических потенциалов протона между двумя водными фазами внутри и вне митохондрий описывается уравнением

$$\Delta E = \Delta \mu_{H^+} = RT \ln \frac{[H^+]_0}{[H^+]_i} + F \Delta \varphi,$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, $[H^+]_o$ и $[H^+]_i$ – концентрации ионов водорода вне и внутри матрикса, соответственно, F – число Фарадея, $\Delta\phi$ – разность потенциалов между окружающей средой и матриксом. П. Митчелл в качестве единицы энергии использовал электрон-вольты:

$$PMF = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} + \Delta\phi$$

Суммарная энергия окислительно-восстановительной реакции, превращенная в разность электрохимических потенциалов ионов водорода, была названа П. Митчеллом протон-движущей силой (PMF – proton motive force). Заменяя натуральный логарифм на десятичный, легко найти величину протон-движущей силы, зная разность pH (ΔpH) и разность потенциалов ($\Delta\phi$) между средой и матриксом при комнатной температуре; выраженная в милливольт, она будет равна

$$PMF (mV) = 60 (mV) \cdot \Delta pH + \Delta\phi.$$

В митохондриях основной вклад в эту сумму вносит мембранный потенциал, который в присутствии субстрата и кислорода составляет около 170-180 мВ. Созданная работой дыхательной цепи разность потенциалов $\Delta\phi$ может быть использована для синтеза АТФ или переноса ионов в митохондрии. Синтез АТФ осуществляется благодаря работе АТФ-синтазы, которая представляет собой протонную АТФазу (H^+ -АТФазу).

Организация компонентов дыхательной цепи в виде четырех комплексов: NADH-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, цитохромов bc_1 , цитохромоксидазы. Роль коэнзима Q и цитохрома c в интеграции комплексов. Коллекторная функция NAD^+ и коэнзима Q в дыхательной цепи. Коэффициент окислительного фосфорилирования P/O, P/2e

Основные переносчики электронов дыхательной цепи организованы в 4 комплекса. Пространственное расположение компонентов таково, что оно облегчает их функционирование и соответствует возрастанию окислительно-восстановительного потенциала. Во внутренней мембране митохондрий выделяют 4 ферментных комплекса: NADH-дегидрогеназа (комплекс I), сукцинатдегидрогеназа (комплекс II), цитохромы bc_1 (комплекс III) и цитохромоксидаза (комплекс IV).

Три комплекса – I, III и IV – функционируют как зависящие от транспорта электронов *протонные помпы*, т.е. используя энергию электронов, эти комплексы обеспечивают перенос H^+ из матрикса в межмембранное пространство. В результате возникает протонный электрохимический потенциал. Комплекс II катализирует окисление сукцината убихиноном. При достиже-

нии определенного значения электрохимического потенциала происходит активация АТФ-синтазы (комплекс V), в ней открывается канал, через который протоны возвращаются из межмембранного пространства, а энергия $\Delta\mu\text{H}^+$ используется для синтеза АТФ. Каждый из трех комплексов обеспечивает необходимый протонный градиент для активации АТФ-синтазы и синтеза 1 молекулы АТФ.

Митохондриальная протон-транслоцирующая NADH-дегидрогеназа (первый пункт энергетического сопряжения) катализирует окисление NADH убихиноном. Реакция сопровождается трансмембранным переносом 4-х протонов при окислении одной молекулы NADH (2 электрона) и генерацией на сопрягающей мембране митохондрий разности электрохимических потенциалов. *Комплекс I* состоит из 46 субъединиц. В составе фермента обнаружено несколько редокс-компонентов, участвующих в передаче электронов с NADH на убихинон – FMN, несколько Fe-S-кластеров и прочно связанный убихинон ([рис. 26.4](#)).

На [рис. 26.4](#) контуры поверхности белка приведены по данным реконструкции электронных микрофотографий фермента *N.crassa*. Гидрофобный домен фермента погружен в липидный бислой. Расположение отдельных субъединиц в мембранной и периферической части фермента показано на основании результатов хроматографического разделения Комплекса I сердца быка на отдельные фрагменты.

Комплекс II (молекулярная масса 125 кДа) катализирует окисление сукцината убихиноном. Он состоит из 4 субъединиц: флавинопротеина, с молекулярной массой 70 кДа; железосерного белка, с молекулярной массой 30 кДа и двух гидрофобных заякоренных субъединиц по 7 и 17 кДа. Флавинопротеид содержит ковалентно связанный флавинмононуклеотид. Железосерные белки – это три различных железосерных кластера: [2Fe-2S] – центр S1; [3Fe-4S] – центр S2; [4Fe-4S] – центр S3. Две субъединицы являются цитохромом *b* и убихинон-связывающим белком.

Комплекс III имеет четыре редокс-центра: гемы *bl* и *bh*, связанные с цитохромом *b*; негемовый железосерный кластер FeS_{III}; включенный в соответствующий апопротеин; гем *c*, присоединенный к апопротеину цитохрома *c*₁ ([рис. 26.5](#)). Наряду с переносчиками восстановительных эквивалентов в состав комплекса входит 8 полипептидов, лишенных простетических групп. Функционирует комплекс III по типу Q-цикла. Участвует в генерации протонного градиента, перенося 2 протона водорода из матрикса в межмембранное пространство.

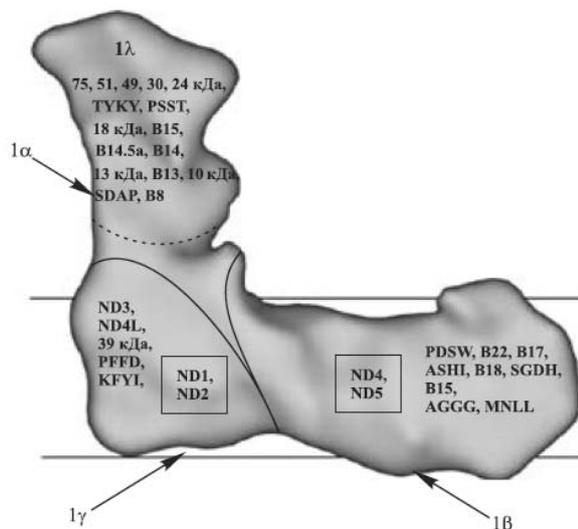


Рис.26.4. Схематическое изображение структуры комплекса I

Цитохромоксидаза (комплекс IV) катализирует окисление восстановленного цитохрома с молекулярным кислородом. Эта реакция сопряжена с генерацией $\Delta\mu\text{H}$. Восстановитель цитохромоксидазы цитохром *c* представляет собой очень стабильный гемопротеин, состоящий из 104 аминокислот и гема *c*. Гем ковалентно связан с апобелком (через SH-группы Cys-14, Cys-17). Цитохромоксидаза содержит 4 редокс-центра: 2 гема *a*-типа (*a* и *a3*) и 2 атома меди (*Cu_A* и *Cu_B*). Цитохромоксидаза содержит 3 крупные субъединицы, кодируемых митохондриальной ДНК, и еще 9 мелких субъединиц, синтезируемых в цитоплазме. Цитохромоксидаза частично погружена в мембрану, а частично экспонирована в воду. Гемы ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны.

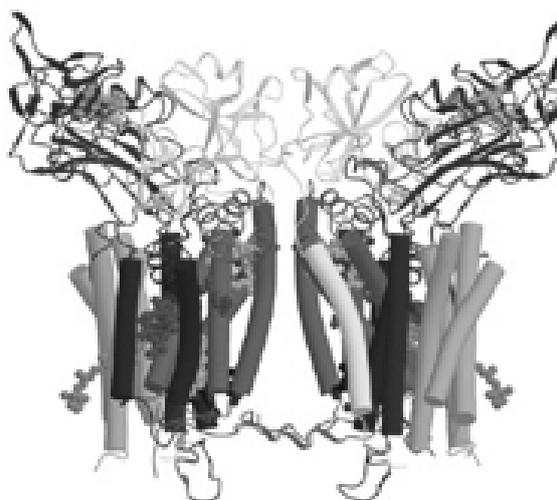


Рис.26.5. Комплекс III (*bc₁*)

Электрон, отнятый от цитохрома *c* переносится непосредственно на *Cu_a*. Двигаясь от поверхности в глубь мембраны, электрон переносится от

Cu_a к гему а и далее к комплексу гема a_3 и Cu_b – последнему компоненту в дыхательной цепи, который восстанавливает O_2 .

Между комплексами электроны переносятся с помощью подвижных переносчиков: убихинона и цитохрома *c*. Двигаясь диффузно через липидный бислой мембраны, убихинон связывает комплексы I и III. Цитохром *c* выполняет аналогичную челночную функцию на участке между комплексами III и IV, диффундируя вдоль поверхности мембраны.

Функцию коллектора восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи выполняют NAD^+ и убихинон. Восстановительные эквиваленты могут поступать в дыхательную цепь на ее различных уровнях, в зависимости от редокс-потенциала окисляемого субстрата. Если он меньше, равен или немного больше $-0,3$ В (редокс-потенциал пары $NADH/NAD^+$), в окислении такого субстрата участвует вся дыхательная цепь. Именно так окисляется большинство субстратов. Часто NAD^+ служит непосредственным окислителем субстрата (ЦТК, окисление жирных кислот и т.д.). В редких случаях $NADP$, а не NAD служит окислителем субстрата. Образовавшийся $NADPH$ может восстанавливать NAD^+ в трансгидрогеназной реакции. Однако этого не происходит в энергезированной мембране, т.к. трансгидрогеназа служит потребителем $\Delta\mu H$, действующим в направлении $NADPH \rightarrow NADP^+$. По этой причине $NADPH$ обычно не подключается к дыхательной цепи, а используется в реакциях восстановительных биосинтезов.

Если редокс-потенциал субстрата значительно ниже, чем у NAD^+ , восстановительные эквиваленты переносятся на средний или конечный участок дыхательной цепи. Так окисляется один из субстратов цикла трикарбоновых кислот сукцинат (редокс-потенциал $+0,03$ В), а также ацил- CoA – субстрат первой оксидоредукции в системе β -окисления жирных кислот. Сукцинат и ацил- CoA -дегидрогеназы питают электронами дыхательную цепь на уровне комплекса bc_1 . В очень редких случаях редокс-потенциал окисляемого субстрата более положителен, чем у CoQ . Тогда восстановительные эквиваленты входят в цепь на уровне цитохрома *c*, так что только цитохромоксидазой $\Delta\mu H$ -генератор участвует в трансформации энергии. Пример – аскорбиновая кислота.

Мерой эффективности дыхания как поставщика энергии для синтеза АТФ, предложенной в 1939 г. В.А. Белицером и Е.Т. Цыбаковой, может служить отношение количества синтезированного АТФ или эстерифицированного фосфата к количеству потребляемого кислорода (ATP/O , P/O , $P/2e$). Этот критерий, называемый коэффициентом фосфорилирования, отражает количество молей АТФ, образованных при восстановлении 1 атома кислорода до H_2O дыхательной цепи (т.е. при прохождении 2 электронов по дыхательной цепи). Для митохондрий, окисляющих NAD -зависимые субстраты, сукцинат или аскорбат, экспериментально измеренные величины P/O оказываются соответственно 3, 2, 1. Эти величины близки величинам, рассчитанным теоретически.

При участии АТФ/ADP-транслоказы АТФ транспортируется в цитоплазму в обмен на ADP. В цитоплазме АТФ используется для совершения ра-

боты. При увеличении расхода АТФ в клетке увеличивается поступление ADP в митохондрии. Повышение концентрации ADP (субстрата АТФ-синтазы) увеличивает скорость синтеза АТФ. При этом увеличивается скорость дыхания. Таким образом, скорость синтеза АТФ точно соответствует потребностям клетки в энергии. Ускорение окислительного фосфорилирования и дыхания при повышении концентрации ADP называется *дыхательным контролем*.

В реакциях дыхательной цепи часть энергии не превращается в энергию макроэргических связей АТФ, а рассеивается в виде тепла. Тепло, освобождающееся в реакциях энергетического обмена, участвует в поддержке температуры тела у теплокровных животных. Некоторые липофильные вещества (жирные кислоты, динитрофенол и др.) могут переносить ионы водорода через внутреннюю мембрану митохондрий, минуя канал АТФ-синтазы, убирая таким образом протонный градиент. Они разобщают процесс переноса электронов по дыхательной цепи и синтез АТФ и поэтому называются *разобщителями*. При действии разобщающих факторов коэффициент P/O снижается, часть энергии выделяется в виде тепла.

Локализация пунктов сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи на основании редокс-потенциалов, действия специфических ингибиторов (ротенон, амитал, антимицин А, цианид, CO, NaN₃)

При переносе водорода на кислород каждая пара электронов, акцептируемых от субстрата, трижды пересекает мембрану и каждый раз выводит пару протонов. Первый переход совершается через восстановленный FMN₂. Вернувшись на внутреннюю поверхность мембраны с помощью железосерных белков, электроны переходят на 2 молекулы убихинона, каждая из которых при этом захватывает протон из внутренней среды, образуя гидрохинон. С его помощью электроны вновь выходят наружу и возвращаются при участии цитохромов.

На внутренней стороне мембраны электроны восстанавливают еще одну пару молекул убихинона и мигрируют наружу в третий раз. Наконец, они возвращаются во внутреннюю среду через систему цитохромов (*c₁, c, a, a₃*) и переходят на кислород. На каждом участке дыхательной цепи, где изменение окислительно-восстановительного потенциала оказывается достаточным для образования необходимой протон-движущей силы (эта разность $\Delta E \approx 0,25$ В), может синтезироваться АТФ. В дыхательной цепи имеется 3 пункта сопряжения окисления и фосфорилирования: между NADH и CoQH₂ ($\Delta E'_{\circ} \approx 0,3$ В), между CoQH₂ и цитохромом *c₁* ($\Delta E'_{\circ} \approx 0,21$ В) и между цитохромом *a* и цитохромом *a₃* ($\Delta E'_{\circ} \approx 0,53$ В). Общая разница потенциалов между NADH и кислородом составляет около 1,2 В, а суммарный электронный ток на внутриклеточных мембранах у человека в состоянии покоя около 100 А, так что мощность аэробного оттока энергии равна 120 Вт (рис. 26.6).

Ток электронов по дыхательной цепи может подавляться при действии на нее специфических и неспецифических ингибиторов. Действие ингибиторов выражается в препятствовании окислению субстратов, чем сокращается выделение водорода в дыхательную цепь. Тяжелые металлы и мышьяк (III) блокируют SH-группы дегидрогеназ. Ротенон и амитал (ингибиторы комплекса I) блокируют образования протонного потенциала: прерывают поступление водорода от NADH. Антимисин А — типичный ингибитор комплекса *bc₁* подавляет циклический перенос электронов. Цианиды, азиды, СО ингибируют цитохромоксидазу, блокируя передачу водорода на кислород. В результате возникает ситуация кислородного голодания, хотя кислород присутствует в избытке. Выключается протонный градиент и связанное с ним фосфорилирование. Наступает энергетический голод и прекращается жизнедеятельность.

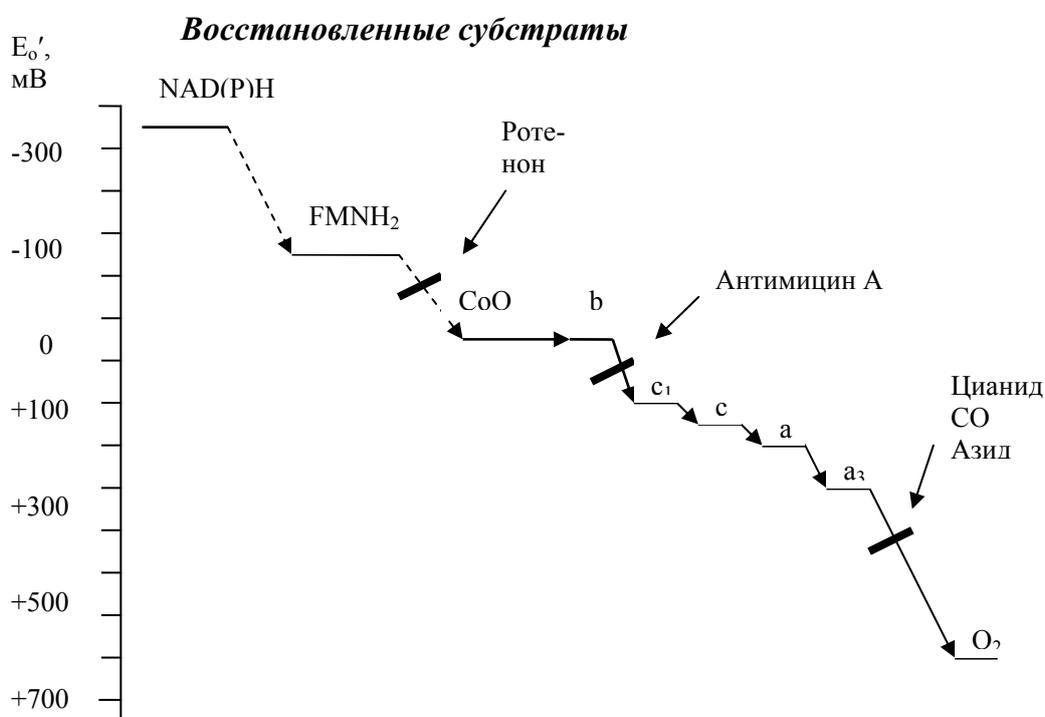


Рис.26.6. Пункты действия ингибиторов дыхательной цепи

Полные и редуцированные дыхательные цепи

У бактерий эффективность дыхательной цепи ниже, чем в митохондриях из-за более простого устройства механизма переноса электронов, шунтированием некоторых $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов дыхательной цепи системами свободного окисления и укорочением цепи при использовании доноров электронов, по редокс-потенциалу более положительных, чем NADH, или акцепторов электронов, более отрицательных, чем кислород.

NADH-дегидрогеназа *E. coli* содержит два редокс-центра (FMN и FeS-кластер) вместо шести в митохондриях. Существуют бактерии, восстанавливающие нитрат до нитрита. У грибов редокс-цепь для восстановления нитрата выглядит таким образом: $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FeS} \rightarrow \text{Mo} \rightarrow \text{NO}_3^-$.

У других бактерий существуют редокс-цепи восстановления фумарата в сукцинат (редокс-потенциал 0,03 В). У некоторых бактерий синтез АТФ сопряжен с образованием метана. Может осуществляться окисление субстратов с положительным редокс-потенциалом. Бактерия *Thiobacillus ferrooxidans* служит примером энергетики такого типа. В качестве энергетического ресурса она использует ион Fe^{2+} , который окисляется кислородом до окисного железа. Существуют и другие примеры редуцированных дыхательных цепей.

Лекция 27

Механизмы образования и использования АТФ в живых системах

Представления о механизмах сопряжения окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Хемиосмотическая теория Митчелла. Электрохимический протонный градиент как форма запасаения энергии

Долгое время вопрос о механизме преобразования энергии, освобождающейся при переносе высокоэнергетических электронов по цепи окислительных ферментов, оставался неясным. Согласно хемиосмотической теории П. Митчелла ([рис. 27.1](#)), сопряжение тканевого дыхания с окислительным фосфорилированием обеспечивается внутренней митохондриальной мембраной, целостность которой обуславливает возникновение движущей силы синтеза АТФ-протонного потенциала. В результате происходит перекачивание протонов из матрикса на цитоплазматическую поверхность и создается градиент рН. Движение протонов в обратном направлении (по каналу фактора Fo) ведет к активации АТФ-синтазы (фактор F₁) и синтезу АТФ из ADP и фосфата. Транспорт АТФ из матрикса в цитоплазму осуществляется переносчиком – транслоказой. Этот фермент катализирует перенос одной молекулы АТФ из матрикса в обмен на одну молекулу ADP, переносимую в матрикс. Нарушение транспорта ADP или фосфата приводит к торможению синтеза АТФ.



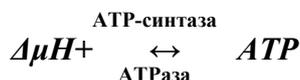
Рис.27.1. Английский биохимик Питер Деннис Митчелл (родился в Митчеме, в семье служащего Кристофера Гиббса Митчелла и Беатрис Дороти Митчелл, окончил Королевский колледж в Тонтоне и колледж Иисуса Кембриджского университета, в 1978 г. за разработку хемиосмотической теории удостоен Нобелевской премии)

Гипотеза П.Митчелла требует соблюдения ряда условий:

- 1) внутренняя митохондриальная мембрана должна быть интактна и непроницаема для протонов, направляющихся снаружи внутрь;
- 2) в результате активности дыхательной цепи ионы водорода поступают в нее изнутри, из матрикса, а освобождаются на наружной стороне мембраны;
- 3) движение ионов водорода, направленное изнутри наружу должно приводить к их накоплению, вследствие чего между двумя сторонами митохондриальной мембраны возникает градиент рН;
- 4) необходимы затраты энергии, которая поставляется при переносе электронов по электронтранспортной цепи;
- 5) синтез АТФ поддерживать наличием электрохимического градиента.

Строение АТФ-синтазного комплекса. Механизм образования АТФ. Обратимость реакции, катализируемой АТФ-синтазой. Разобщение транспорта электронов и синтеза АТФ; действие 2,4-динитрофенола

В настоящее время протонные АТФ-синтазы выделены практически из всех типов сопрягающих мембран: митохондрий, хлоропластов, хромофоров. АТФ-синтазный комплекс (H⁺-АТРаза) – обратимый фермент, обладающий как АТФ-синтазной, так и АТРазной активностью. Синтез АТФ осуществляется за счет протонного градиента ΔμH⁺, а гидролиз АТФ приводит к тому, что протонная АТРаза сопряженно генерирует трансмембранную разность электрохимического потенциала H⁺. В H⁺-АТРазае происходят процессы по общей схеме:



АТФ-синтазный комплекс (F_0F_1 -АТРаза) состоит из растворимой АТФ-синтазы (фактор F_1) и мембранных компонентов (комплекс F_0) (Рис. 27.2).

Сопрягающий фактор АТФ-синтазы (F_1 для митохондрий и CF_1 для хлоропластов) представляет собой полифункциональный белок, имеющий сложную четвертичную структуру. Он построен из трех типов крупных субъединиц – α , β , γ с молекулярной массой 30000-60000 Да и двух типов меньших субъединиц δ , ϵ с молекулярной массой 11000-20000 Да. Стехиометрия комплекса – $3\alpha 3\beta \gamma \delta \epsilon$. Разложение его на субъединицы ведет к потере ферментативной активности. «Шляпка» высотой 80Å и шириной 100Å грибовидного выроста АТФ-синтазы соответствует фактору F_1 , частично погруженному в мембрану, в основании которого находится гидрофобный белок комплекса F_0 , который включает 3 типа полипептидов (a, b, c) с молекулярными массами от 6500 до 30000 кДа и обеспечивает связывание фактора F_1 с мембраной и перенос протонов при работе фермента.

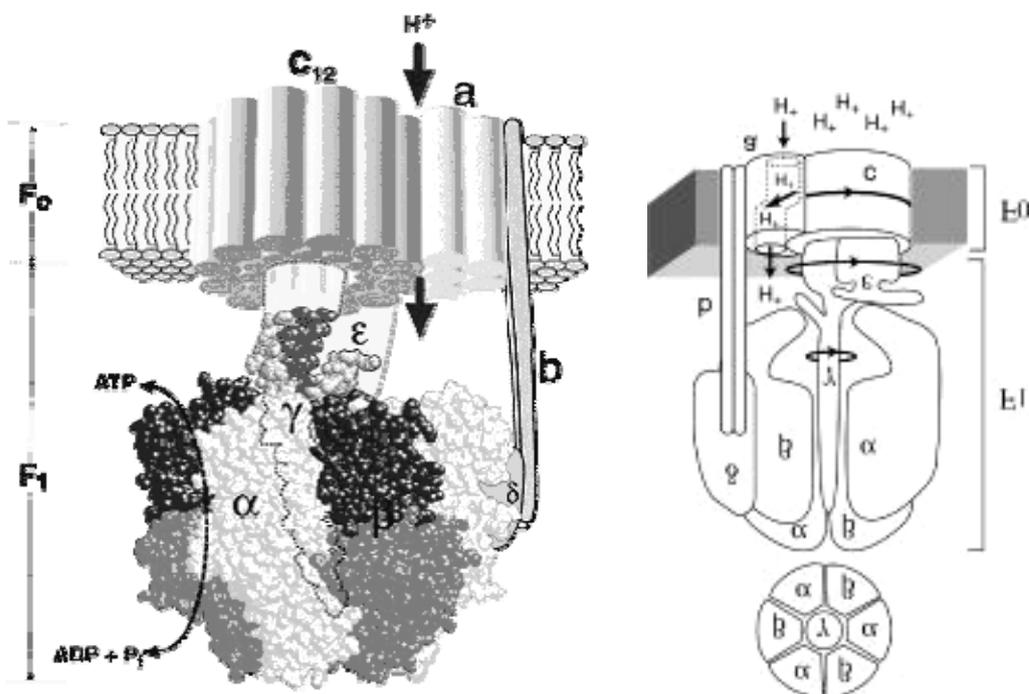


Рис.27.2. Общая топография АТФ-синтазного комплекса
 F_1 – сопрягающий фактор, F_0 – протонный канал (пояснения в тексте)

Комплекс F_1 может поворачиваться вокруг оси, совпадающей по направлению с субъединицей γ . При повороте на 120° каждая из α и β -субъединиц перемещается на место другой такой же, а при повороте на 60° субъединицы меняются местами. В силу некоторой асимметричности вращения F_1 -комплекса переводит его β -субъединицы при каждом повороте в новое положение, где они попадают в другое микроокружение. Это и приводит к изменению состояния и конформационной перестройке активных центров при вращении F_1 . Каждый из трех активных центров в результате вращения

F₁-комплекса может поочередно находиться в одном из трех конформационных состояний, которые различаются по степени сродства молекул АТФ, АДФ и Р_i к каталитическому центру. В *состоянии 1* центр β-субъединицы открыт и в нем связываются молекулы АДФ и Р_n, которые сравнительно слабо удерживаются центром.

Вращение и конформационные перестройки комплекса F₁ переводят этот центр в *состояние 2*, где непосредственно происходит синтез АТФ. Здесь АДФ и Р_n прочно фиксируются в каталитическом центре, находясь в активной конфигурации, необходимой для образования ковалентной связи между фосфатными группами АДФ и Р_n. Поэтому на этой стадии не требуется притока энергии извне. В *состоянии 2* в каталитическом центре самопроизвольно идет образование и разрыв ковалентной связи АДФ-Р, поскольку константа равновесия АТФ ↔ АДФ + Р_i близка к единице.

На следующем этапе центр переходит в *состояние 3*, где за счет энергозависимой структурной перестройки происходит ослабление прочной связи молекулы АТФ с центром и выход ее наружу. На освободившееся место из раствора приходят новые молекулы АДФ и Р_n. Перестройки носят кооперативный характер и затрагивают состояние всех трех каталитических центров β-субъединиц. Поскольку весь цикл включает 3 этапа, а в Н⁺-АТФ-синтазе имеется 3 субъединицы, то после каждого структурного перехода в растворе появляется новая молекула АТФ.

F₀ формирует канал, по которому протоны поступают к активному центру АТФазы. Проводимость протонов носит специфический характер и подавляется антибиотиком олигомицином и ДЦКД (N,N'-дициклогексилкарбодиимид), ингибиторами Н⁺-АТФ-синтазы. Особым образом организованный канал обеспечивает прохождение протона через всю мембрану из водной фазы в гидрофобную область мембраны, а затем из нее в воду по другую сторону от липопротеинового барьера. Основную роль в переносе играет ДЦКД-связывающий протеолипид. Предполагают, что он располагается поперек мембраны, так что полярная часть оказывается на внешней поверхности мембраны и служит входом в канал. Наиболее вероятным механизмом переноса протона представляется эстафетная передача по протон-донорным и протон-акцепторным группам аминокислот, включая остатки аргинина, тирозина, глутамина.

Комплекс F₀ - вращающийся ансамбль субъединиц с 9-12 остановками, позволяющими прерывать поток протонов. Временное связывание протонов может осуществляться остатком аспарагиновой кислоты на каждой субъединице. Каждый поворот γ-субъединицы внутри комплекса происходит в соответствии с тем, заполнено ли гидролитическое место АТФ или АДФ и Р_n. Эти конформационные изменения (механические изменения структуры) обеспечивает перенос протонов водорода на каждый третий этап цикла. Связывание, гидролиз и освобождение АТФ и АДФ в F₀-F₁-АТФ-синтазе зависит от величин и геометрии расположения заряда в активном состоянии. Пока еще не ясна природа и расположение заряженных групп, ответственных за непосредственное вращение молекулярного мотора Н-АТФ-синтазы.

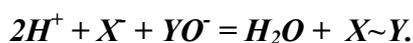
Механизм образования АТФ

Согласно хемиосмотическому механизму захват энергии, выделяющейся в процессах электронного транспорта, осуществляется за счет создания трансмембранной разности $\Delta\mu\text{H}^+$, а перенос энергии к АТФ-синтазе обеспечивается потоком протонов через ее протонный канал. Синтез АТФ из ADP и Pi может происходить и в отсутствие переносчиков электронов. Для этого необходима лишь разность электрохимических потенциалов H^+ на мембране, в которой находится АТФ-синтаза. Хемиосмотический принцип трансформации энергии не может объяснить непосредственного молекулярного механизма синтеза АТФ.

Согласно одному из первых вариантов хемиосмотической гипотезы, образование АТФ сопряжено с распадом высокоэнергетического предшественника: $\text{X}\sim\text{Y}$. Считали, что существуют некие компоненты (подвижные в липидах ионы) X и Y, находящиеся в мембране в виде XH и YOH , которые могут диссоциировать:



В митохондриальной мембране, у внешней стороны, происходит реакция конденсации:



Эта реакция сильно сдвинута вправо за счет повышения трансмембранного $\Delta\mu\text{H}$ и движения анионов X^- и YO^- к внешней поверхности под действием сил трансмембранного электрического поля. Однако эта гипотеза оказалась несостоятельной.

Согласно представлениям Митчелла, в активный центр АТФ-синтазы нагнетаются протоны, которые непосредственно восстанавливают фосфорильный кислород неорганического фосфата в активном центре. Преодоление энергетического барьера элементарного акта синтеза АТФ достигается за счет горячих протонов, которые разгоняются электрическим полем в протонном канале H^+ -АТФазы. Такое представление оказалось термодинамически невозможным.

Другое предположение о существовании некоего аккумулятора, который накапливает протоны, движущиеся внутри АТФ-синтазы до тех пор, пока не наберется энергия, достаточная для синтеза одной молекулы АТФ, также не подтвердилось.

Проблему синтеза АТФ в H^+ -АТФ-синтазе следует рассматривать, исходя из общих соображений о роли электрон-конформационных взаимодействий в механизмах ферментативного катализа. Как известно, элементарный акт катализа осуществляется в активном центре спонтанно, когда в нем достигается реакционноспособная конфигурация между реагирующими группами субстрата и фермента, расположенными на расстоянии порядка длин хи-

мических связей. На стадиях взаимодействия субстрата и фермента при образовании активной конфигурации и затем при отщеплении образовавшегося продукта в ферменте происходят конформационные изменения. Такие внешние факторы, как температура, ионная сила раствора, вязкость, могут влиять на эти релаксационные стадии. Однако непосредственный акт катализа в сформированной активной конфигурации уже не требует тепловой энергии активации.

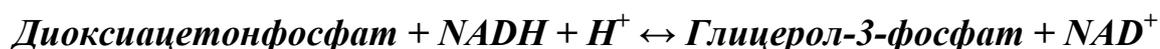
Именно с этими представлениями согласуются результаты Бойера. Элементарное образование АТФ может происходить в активном центре H^+ -АТФ-синтазы в условиях дезэнергизации мембраны, когда $\Delta\mu H=0$, и даже в активном центре изолированного фактора F_1 , находящегося в растворе. Однако валового синтеза АТФ при этом не происходит. При энергизации мембраны за счет увеличения $\Delta\mu H$ процесс ускоряется в 1000 раз. Оказалось, что энергия $\Delta\mu H$ используется в основном для вытеснения прочно связанного АТФ из каталитического центра. Энергия также затрачивается на связывание фосфата и ADP с ферментом.

**Окисление цитоплазматического NADH в дыхательной цепи.
Глицеролфосфатный и малат-аспартатный челночные механизмы**

Молекулы цитоплазматического NADH не способны сами проникать через мембрану внутрь митохондрий. Однако отдаваемые ими электроны могут включаться в митохондриальную цепь биологического окисления с помощью двух челночных механизмов.

Глицеролфосфатный челночный механизм

Цитоплазматический NADH сначала реагирует с цитоплазматическим дигидроксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется NAD-зависимой цитоплазматической глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой:



Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная) глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа (флавиновый фермент) вновь окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата:



На уровне CoQ восстановленный флавопротеин (фермент- $FADH_2$) вводит приобретенные им электроны в цепь биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму и может вновь взаимодействовать с цитоплазматическим $NADH + H^+$. Таким образом, пара электронов (из одной молекулы цитоплазматического $NADH + H^+$), вводимая в дыхательную цепь

с помощью глицеролфосфатного челночного механизма, дает не три, а две молекулы АТФ. Было показано, что с помощью *глицеролфосфатного челночного механизма* лишь в скелетных мышцах и мозге осуществляется перенос восстановленных эквивалентов от цитозольного $\text{NADH} + \text{H}^+$ в митохондрии.

В клетках печени, почек и сердца действует более сложный *малат-аспаратный челночный механизм* (Рис. 27.3).

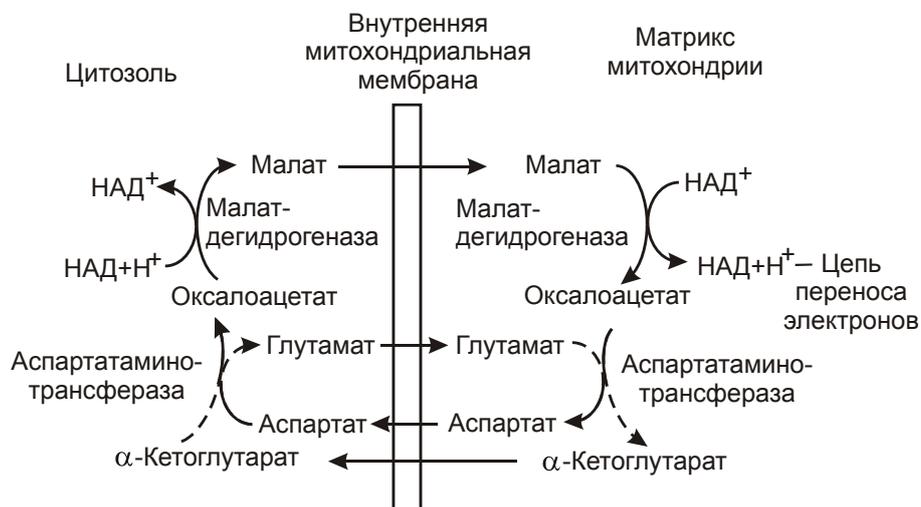


Рис.27.3. Малат-аспаратный челночный механизм

Действие такого челночного механизма становится возможным благодаря присутствию малатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы как в цитозоле, так и в митохондриях. Установлено, что от цитозольного $\text{NADH} + \text{H}^+$ восстановленные эквиваленты сначала при участии фермента малатдегидрогеназы переносятся на цитозольный оксалоацетат. В результате образуется малат, который с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс. Здесь малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный NAD^+ восстанавливается в $\text{NADH} + \text{H}^+$, который может теперь передавать свои электроны в цепь дыхательных ферментов, локализованную на внутренней мембране митохондрии. В свою очередь образовавшийся оксалоацетат в присутствии глутамата и фермента аспаратаминотрансферазы вступает в реакцию трансаминирования. Образующиеся аспарат и α -кетоглутарат с помощью специальных транспортных систем способны проходить через мембрану митохондрий.

В цитозоле транспортирование регенерирует оксалоацетат, что вызывает к действию следующий цикл. В целом процесс включает легкообратимые реакции, происходит без потребления энергии, его «движущей силой» является постоянное восстановление в цитозоле NAD^+ глицеральдегид-3-фосфатом, образующимся при катаболизме глюкозы. При функционировании малат-аспаратного механизма в результате полного окисления одной молекулы глюкозы может образоваться не 36, а 38 молекул АТФ.

Лекция 28

Интеграция клеточного метаболизма

Обмен веществ в живых организмах протекает не хаотично; он интегрирован и тонко настроен, благодаря чему поддерживаются постоянство внутренней среды и целостность организма. Процессы обмена белков, нуклеиновых кислот, липидов и углеводов тесно взаимосвязаны. Эта связь выражается во взаимном превращении одних веществ в другие, которое диктуется физиологическими потребностями организма. Таким образом, все превращения составляют целостный процесс метаболизма.

На [рис. 28.1](#) представлена упрощенная схема интеграции основных метаболических путей, общих для большинства клеток и организмов. Видно, что процессы катаболизма и биосинтеза сложных органических соединений (белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов) связаны между собой, в первую очередь, благодаря пирувату, ацетил-СоА, промежуточным соединениям цикла лимонной кислоты □ оксалоацетату и α-кетоглутарату.

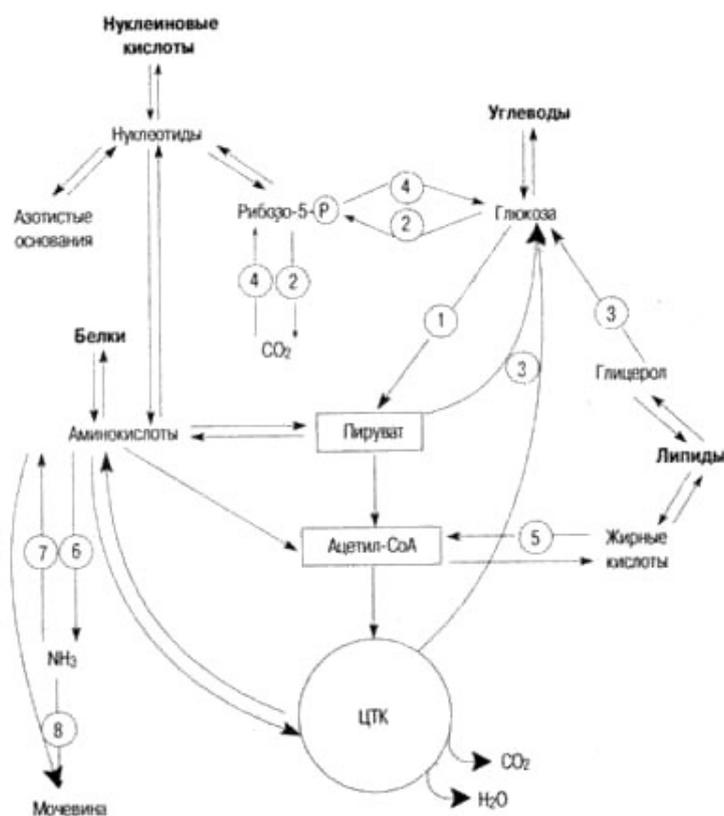


Рис.28.1. Взаимосвязь основных клеточных процессов. 1 □ гликолиз; 2 □ пентозофосфатный путь; 3 □ глюконеогенез; 4 □ цикл Кальвина; 5 □ окисление жирных кислот; 6 □ дезаминирование; 7 □ аминирование кетокислот; 8 □ цикл мочевины; ЦТК □ цикл трикарбоновых кислот

Пируват □ трехуглеродная α-кислота. Она находится в точке перекреста ряда метаболических путей. Пируват связывает гликолиз и глюконеогенез, а также обмен углеводов с обменом липидов, белков, изопреноидов, ке-

тоновых тел. Он образуется в клетке в основном при катаболизме гексоз, при окислении лактата, который накапливается в мышцах при анаэробном гликолизе. В этом случае образование лактата позволяет организму быстро регенерировать NAD^+ , необходимый для запасания АТФ в гликолизе (процесс сокращения и расслабления мышечных волокон требует гидролиза АТФ).

Накапливающийся в мышцах лактат поступает в кровь и переносится в печень, где вновь окисляется в пируват. Вступая на путь глюконеогенеза, пируват может превратиться в глюкозу. Эта последовательность реакций известна как цикл Кори.

Аланин является продуктом трансаминирования пирувата с аминокислотами, образованными в ходе протеолиза белков. С током крови аланин поступает в печень, где снова превращается в пируват, выполняя роль переносчика аммонийного азота, который в печени включается в цикл образования мочевины. Кроме того, образующийся из пирувата аланин может включаться в состав пептидов.

Пируват участвует также в реакциях карбоксилирования и декарбоксилирования. В первом процессе, (идущем в митохондриях), образуется оксалоацетат, который может включаться в цикл лимонной кислоты (одна из важнейших анаплеротических реакций) либо преобразовываться в фосфоенолпируват, а затем – в глюкозу (глюконеогенез). Во втором случае пируват подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием ацетил-СоА, который также является ключевым метаболитом для еще более разветвленных метаболических путей.

Ацетил-СоА – активированная форма уксусной кислоты. Является связующим звеном в обмене белков, жиров и углеводов. Ацетил-СоА образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата – промежуточного продукта обмена углеводов, глицерола и аминокислот. Жирные кислоты и практически все аминокислоты превращаются в ацетил-СоА, который, конденсируясь с оксалоацетатом, вступает в цикл лимонной кислоты. В этот цикл включаются и некоторые аминокислоты после превращения их в α -кетоглутарат, оксалоацетат, сукцинат и фумарат.

Цикл лимонной кислоты – основной путь, по которому происходит окислительный распад в тканях белков, жиров и углеводов до углекислого газа и воды. Все интермедиаты этого цикла являются общими промежуточными продуктами превращения белков, жиров и углеводов. Одновременно отдельные интермедиаты цикла лимонной кислоты могут быть участниками разнообразных процессов биосинтеза. Так, например, оксалоацетат и α -кетоглутарат, вступая в процесс переаминирования, образуют соответственно аспартат и глутамат, которые используются для биосинтеза белков, участвуют в детоксикации аммиака.

Судьба ацетил-СоА, как и других ключевых метаболитов, зависит от потребностей клетки: он может быть полностью окислен в цикле лимонной кислоты, являясь его субстратом; может подвергаться последовательной конденсации с образованием β -гидрокси- β -метил-глутарил-СоА – предшественника холестерина, терпеновых соединений (изопреноидов), кетоновых тел

(ацетоацетат, β -гидроксибутират, ацетон); может превращаться в жирные кислоты ([рис. 28.2](#)). В организме млекопитающих ацетил-СоА не способен превращаться в углеводы. В то же время в клетках растений и микроорганизмов возможен синтез предшественников глюконеогенеза, а значит, и углеводов из ацетил-СоА.

Кроме перечисленных реакций, ацетил-СоА принимает участие в синтезе аминокислот, в частности аргинина, лейцина, лизина (в клетках грибов), цистеина (у некоторых микроорганизмов).

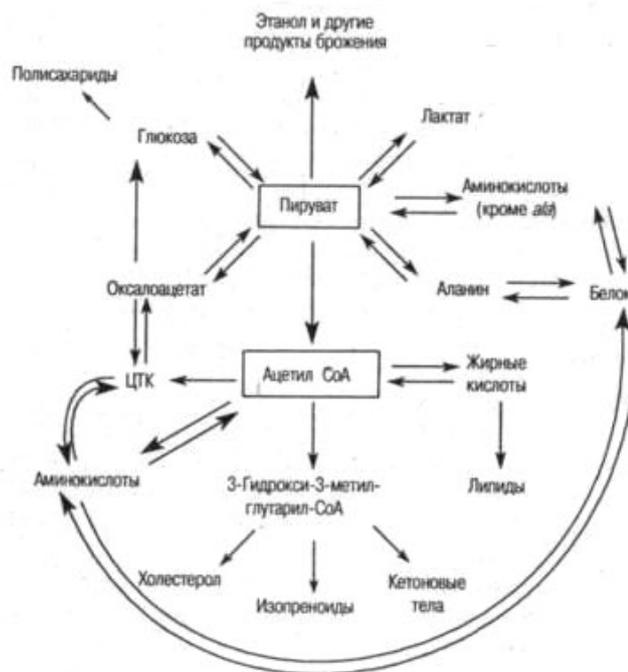


Рис.28.2.Основные превращения пирувата и ацетил-СоА в клеточном метаболизме

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что все метаболические процессы, протекающие в клетке, связаны между собой с помощью промежуточных метаболитов, которые являются продуктами одних метаболических путей и субстратами других. Такая взаимосвязь и взаимозависимость метаболических процессов позволяет клетке координировать свои возможности с потребностями и быстро настраивать уровень обмена веществ в соответствии с меняющимися условиями. Понятно, что интеграция клеточного обмена была бы невозможна без регуляции метаболических путей.

Основные аспекты регуляции метаболизма

Метаболические пути регулируются на трех уровнях.

Первый – количество ферментов, доступное через транскрипцию, трансляцию и оборот белков (протеолитическая деградация). Второй – каталитическая активность ферментов, контролируемая аллостерическими модуляторами, активаторами, конкурентными ингибиторами (агонистами и анта-

гонистами соответственно) и посттрансляционными модификациями, такими, как фосфорилирование, ацетилирование и гликозилирование под контролем гормонов, ростовых факторов и нейротрансмиттеров.

Третий – субстратная доступность (концентрация), контролируемая стационарными условиями и компартментализацией. Последняя зависит от систем активного мембранного транспорта (помпы, транспортеры, требующие затраты энергии) и пассивной диффузии через субстратспецифические мембранные белки (ионные каналы). Диффузия контролируется только концентрационными градиентами.

Химические реакции, протекающие в клетках, катализируются ферментами. Поэтому неудивительно, что большинство способов регуляции обмена веществ основаны на двух ведущих процессах: изменении концентрации ферментов и их активности. Эти способы регуляции метаболизма характерны для всех клеток и осуществляются с помощью разнообразных механизмов в ответ на сигналы разного рода. Кроме того, в клетках могут осуществляться и другие способы регуляции метаболизма.

Регуляция на уровне транскрипции

Транскрипционный уровень регуляции необходим для изменения количества мРНК, определяющих структуру ферментов, а кроме того – белков-гистонов, рибосомальных, транспортных белков. Группа последних, не обладая каталитической активностью, также принимает большое участие в изменении скорости соответствующих процессов (формирование хромосом и рибосом, транспорт веществ через мембраны), а значит, и в метаболизме в целом.

Чаще всего процесс транскрипции регулируется на уровне инициации транскрипции, но, кроме того, могут регулироваться скорость элонгации транскрипции и частота ее преждевременной терминации. Это достаточно медленный путь регуляции обменных процессов путем индукции-репрессии соответствующих генов. (Более детально транскрипционный уровень регуляции метаболических путей рассмотрен в лекции 30).

Аллостерическая регуляция активности ферментов

Аллостерическая регуляция является одним из самых быстродействующих и гибких типов модуляции активности ключевых метаболических ферментов. Она осуществляется с помощью молекул-эффекторов, взаимодействующих с аллостерическим центром фермента. В любом биосинтетическом или катаболическом процессе есть одна скорость-лимитирующая реакция, катализируемая ключевым ферментом. Иногда их бывает несколько.

Аллостерическими эффекторами могут выступать самые различные вещества: субстраты и конечные продукты метаболических путей, иногда – промежуточные метаболиты; в катаболических процессах □ нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты, а также переносчики восстановительных

эквивалентов; в каскадных реакциях сАМР и сGMP, которые регулируют активность ферментов (например, протеинкиназ), участвующих в ковалентной модификации белков; ионы металлов и множество иных соединений (рис. 28.3).

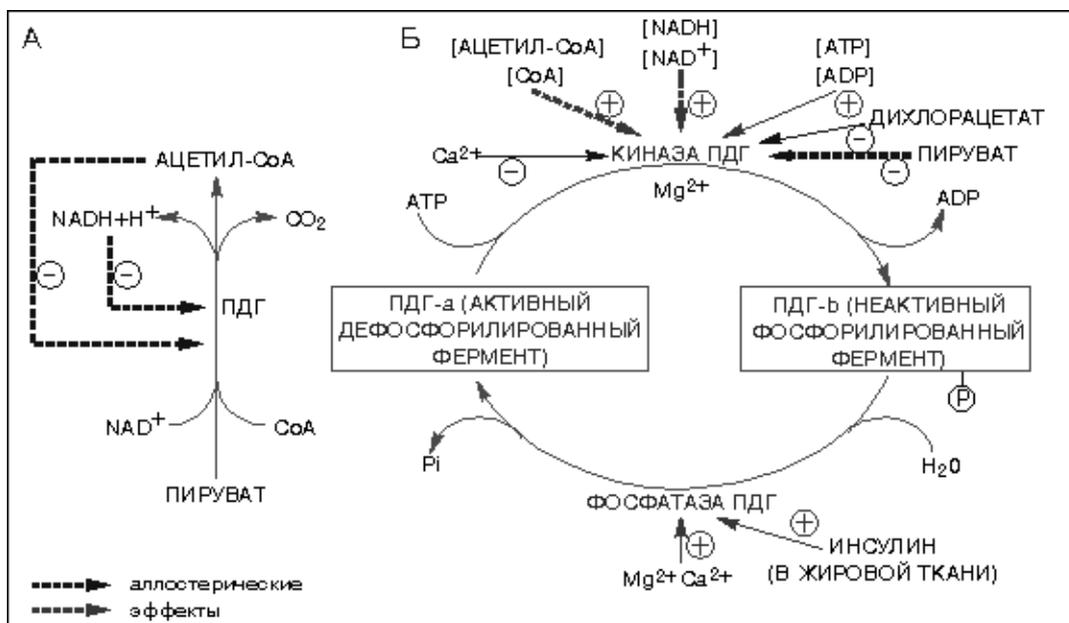


Рис.28.3. Регуляция активности пируватдегидрогеназы: А – аллостерическая регуляция пируватдегидрогеназы; Б – аллостерическая регуляция киназы пируватдегидрогеназы; ковалентная модификация пируватдегидрогеназы (+) – положительный эффект; (□) □ отрицательный

Эффекторы могут осуществлять активацию либо ингибирование фермента. Примеры аллостерической регуляции активности ферментов: фосфофруктокиназа (гликолиз); пируватдегидрогеназа (окислительное декарбоксилирование пирувата); аспартаткарбамоилтрансфераза (синтез пиримидиновых нуклеотидов) и др.

Ковалентная модификация ферментов

Еще одним способом изменять активность ферментов и таким образом, направленность метаболических процессов, является ковалентная или химическая модификация. Суть данного типа регуляции состоит в превращении активных форм ферментов в неактивные, и наоборот. Осуществляется такое взаимопревращение форм фермента путем ковалентного присоединения небольшой химической молекулы (фосфорной кислоты, АМР, уксусной кислоты) к определенным аминокислотным остаткам в молекуле фермента. Таковыми аминокислотами являются серин, треонин и тирозин. Процессы ковалентной модификации находятся под разнообразным контролем, в том числе и гормональным. Классическим примером такого рода регуляции является регуляция метаболизма гликогена в печени. Например, метаболизм гликогена определяется активностью гликогенфосфорилазы (мобилизация гликогена) и

гликоген-синтазы (гликогеногенез). Активность этих ферментов регулируется координированно, т.е. если активна гликогенфосфорилаза, неактивна гликоген-синтаза. Следовательно, при определенных условиях в клетке будет превалировать либо расщепление, либо синтез гликогена (рис. 28.4).

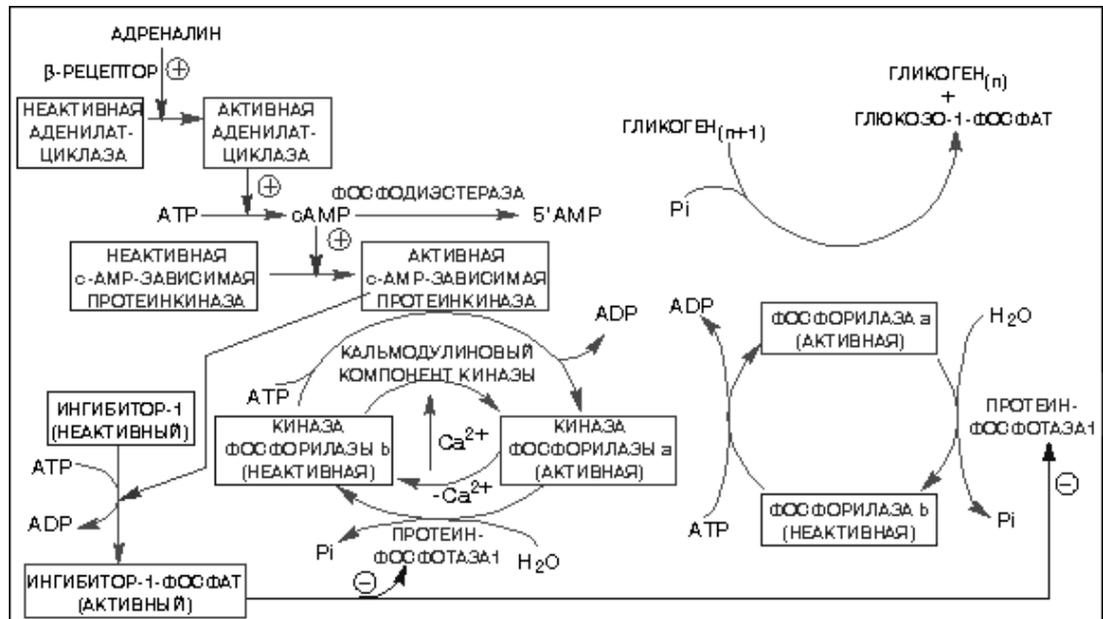


Рис.28.4. Регуляция активности гликогенфосфорилазы ковалентной модификацией (фосфорилирование-дефосфорилирование)

Ковалентная модификация регуляторных ферментов – заключительная стадия каскада реакций, передающих и усиливающих регуляторное действие некоторых гормонов непосредственно на обмен веществ в клетке.

Гормональная регуляция

Гормоны – сигнальные вещества, образующиеся в клетках эндокринных желез; поэтому гормональная регуляция свойственна только высшим организмам. Гормоны могут регулировать активность ферментов на уровне ковалентной модификации. Кроме того, они способны оказывать воздействие на скорость транскрипции (транскрипционная регуляция).

Из специализированных клеток, в которых происходит синтез гормонов, последние поступают в кровь и переносятся к клеткам-мишеням, имеющим рецепторы, способные связывать гормоны и тем самым воспринимать гормональный сигнал. Связывание гормона рецептором запускает каскад реакций с участием молекул-посредников. Этот процесс завершается клеточным ответом.

Липофильные гормоны связываются с внутриклеточным рецептором (белок) и регулируют транскрипцию определенных генов.

Гидрофильные гормоны действуют на клетки-мишени за счет связывания с рецепторами на плазматической мембране ([рис. 28.4](#)).

Кроме гормонов аналогичным действием обладают другие сигнальные вещества: медиаторы, нейромедиаторы, ростовые факторы. Четкой границы, позволяющей отличать гормоны от перечисленных веществ, нет. Медиаторами называют сигнальные вещества, которые продуцируются не железами внутренней секреции, а различными типами клеток. К ним относят гистамин, простагландины, которые обладают гормоноподобным действием. Нейромедиаторами считают сигнальные вещества, продуцируемые клетками центральной нервной системы.

Посттранскрипционная и посттрансляционная модификация макромолекул

Модификация и/или процессинг первичных РНК-транскриптов осуществляются с разной скоростью, от чего зависит концентрация зрелых молекул РНК, способных транслироваться, а значит, и интенсивность белкового синтеза. В свою очередь полипептиды синтезированные на рибосомах, прежде чем превратиться в зрелый белок, также должны модифицироваться (см. лекцию 31). В случае ферментов речь идет об их ковалентной модификации.

Изменение концентрации метаболитов

Важным условием, обеспечивающим высокую скорость того или иного метаболического пути, является концентрация субстратов. Она может зависеть от интенсивности протекания других процессов, в которых также расходуются эти субстраты (конкуренция), или скорости транспорта данных веществ через мембраны (плазматическую или органелл). Кроме того, скорость метаболических процессов определяется концентрацией кофакторов. Например, гликолиз и ЦТК регулируются доступностью ADP на уровне изменения активности ключевых аллостерических ферментов.

У эукариотических клеток важную роль в регуляции и интеграции клеточного обмена играет компартментализация, т.е. разграничение метаболизма в пространственно разделенных мембраной участках клетки (компартаментах). Избирательная проницаемость мембран определяет судьбу ряда метаболитов. Скорость трансмембранного переноса веществ, их взаимодействие с мембраной служат сигналом изменения состояния клетки, направленности в ней метаболических путей ([табл. 28.1](#)).

Компартментализация основных метаболических процессов в эукариотической клетке

Компартмент	Метаболический путь
Цитозоль	Гликолиз Пентозофосфатный путь Синтез жирных кислот Синтез триацилглицеролов Синтез нуклеозидтрифосфатов
Матрикс митохондрий	Окислительное декарбоксилирование пирувата Цикл лимонной кислоты β -окисление жирных кислот Синтез кетоновых тел Окислительное фосфорилирование
Два компартмента – цитозоль и матрикс митохондрий	Глюконеогенез Синтез мочевины Синтез гема

Мембранная регуляция

Важнейшими функциями мембраны являются: барьерная, транспортная, осмотическая, электрическая, структурная, энергетическая, биосинтетическая, рецепторно-регуляторная и др. Такое многообразие функций мембраны возможно в силу ее мобильной структуры.

Мембраны формируются из двойного слоя фосфолипидов с некоторым количеством других липидов (галактолипидов, стероидов, жирных кислот и др.). Основную роль в их формировании играют гидрофобные связи (липид-липид, липид-белок, белок-белок). В состав мембран входят хемо-, фото- и механорецепторы белковой природы, чувствительные к действию химических и физических факторов. Эти рецепторы воспринимают сигналы, поступающие из внешней и внутренней среды, обеспечивая адаптивные ответы клеток на изменения условий существования. Составные компоненты мембран синтезируются под контролем генного аппарата и, в свою очередь, контролируют его работу.

В основе мембранной регуляции лежит неравновесное состояние, поддерживаемое в каждой клетке на определенном стационарном уровне благодаря работе ионных насосов (помп). Примером может служить влияние мембранной регуляции на изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Его концентрация в цитоплазме поддерживается на очень низком уровне (10^{-7} М). Повышение концентрации кальция до 10^{-6} М влияет на активность Ca^{2+} -

зависимых протеинкиназ, фосфорилирующих белки, состояние цитоскелета, сократительную активность актомиозинового комплекса цитоплазмы, секреторную и митотическую активность и др. Эти процессы кальций регулирует, связываясь с кальмодулином и другими кальцийсвязывающими белками.

Таким образом, совокупность реакций, составляющих обмен веществ, в живом организме строго скоординирована и приспособлена к его потребностям. Эти потребности в значительной мере определяются составом среды, в которой находится данный организм. Кроме того, у высших организмов они зависят от сигналов, которые получает данная клеточная популяция либо непосредственно, либо опосредованным путем (через лимфу и кровь, нервную систему и др.). Регуляция метаболизма через изменение концентрации и активности ферментов характерна для всех клеток и реализуется с помощью разнообразных механизмов.

Как известно, активность ферментов зависит от физико-химических условий среды: концентрации субстрата и конечных продуктов реакции, значений pH, ионной силы, окислительно-восстановительного потенциала, изменений содержания коферментов (NAD, NADP и др.) и кофакторов (ионов металлов). В процессе фосфорилирования протеинкиназами или дефосфорилировании фосфатазами, при ацетилировании, метилировании происходит модификация ферментов и изменение их активности.

Ферментативная активность регулируется также в процессе связывания и освобождения ферментов мембранами, блокирования специфическими белковыми ингибиторами и в результате их распада. Оперативный способ изменения активности ферментов – аллостерическая регуляция, которая осуществляется специфическими эффекторами □ активаторами или ингибиторами, в качестве которых могут выступать трофические факторы, промежуточные метаболиты, гормоны и другие, физиологически активные вещества.

МОДУЛЬ III. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Лекция 29 Репликация ДНК

Согласно гипотезе Дж.Уотсона и Ф.Крика, каждая из цепей двойной спирали ДНК служит матрицей для репликации комплементарных дочерних цепей. При этом образуются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК, идентичные родительской, причем каждая из этих молекул содержит одну неизменную цепь родительской ДНК. Этот механизм репликации ДНК, названный полуконсервативным, был подтвержден в опытах на клетках *E.coli* в 1957 г. М. Мезелсоном и Ф. Сталем. Исключены консервативный способ репликации, при котором одна дочерняя ДНК должна содержать обе исходные цепи, а вторая состоять из двух новосинтезированных цепей, и дисперсивный механизм репликации, при котором каждая дочерняя цепь ДНК состоит из участков родительской и новообразованной ДНК (рис. 29.1).

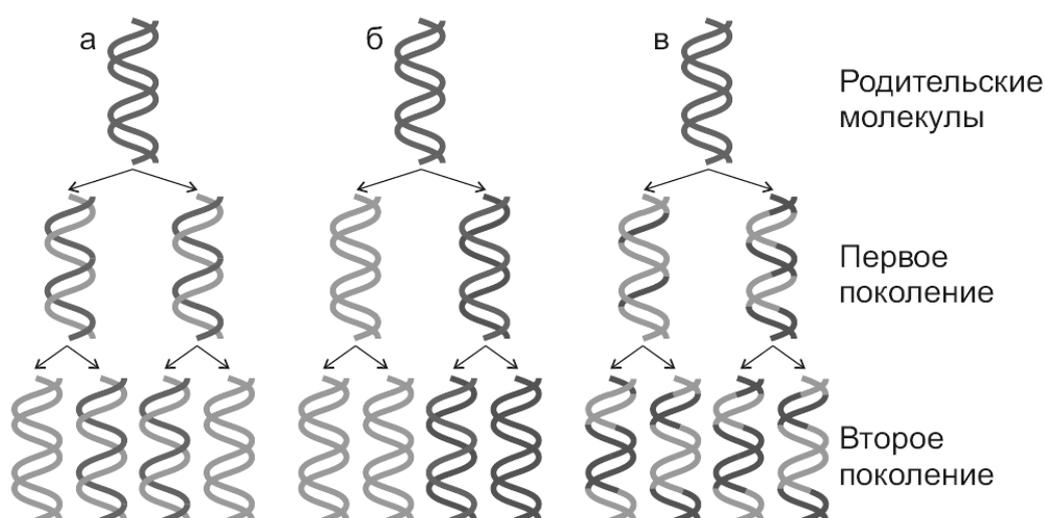


Рис.29.1. Три механизма репликации ДНК: а) полуконсервативный; б) консервативный; в) дисперсивный

Для биосинтеза ДНК необходимы:

1) неспаренная цепь ДНК, которая служит матрицей, и цепь-затравка, к которой присоединяются новые нуклеотиды;

2) полный набор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP). При отсутствии хотя бы одного из них синтез ДНК не происходит. Цепь удлиняется от затравки, имеющей свободную 3'-ОН, в направлении 5'→3' (путем присоединения следующего нуклеотида в соответствии с информацией, заложенной в матрице). Источником энергии в реакциях полимеризации мононуклеотидов является энергия, освобождаемая всеми четырьмя типами дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, участвующих в синтезе ДНК. Расщепление

пирофосфата до неорганического фосфата при участии неорганической пирофосфатазы сдвигает реакцию в сторону удлинения цепи;

3) ферменты и белки, участвующие в синтезе ДНК: ДНК-полимеразы, топоизомеразы (гиразы), хеликазы и лигазы, праймаза, *ssb*-белки. Весь комплекс, состоящий более чем из 20 репликативных ферментов и факторов, называется ДНК-репликационной системой, или реплисомой.

ДНК-зависимые ДНК-полимеразы – ключевые ферменты репликативного процесса, использующие принцип комплементарности для наращивания полинуклеотидных цепей. У прокариот есть три ДНК-полимеразы: Pol I, Pol II и Pol III. В репликации ДНК участвуют Pol I и Pol III. ДНК-полимераза I обладает полимеразной и (3'→5', 5'→3')-экзонуклеазной активностью, участвует в удалении праймера, застройке бреши, образовавшейся на месте праймера, коррекции ошибок при репликации, а также в репарации ДНК. В клетках *E.coli* насчитывается около 400 молекул этого фермента. Pol III осуществляет репаративный синтез ДНК.

Основным ферментом, катализирующим биосинтез новообразованной ДНК у прокариот, является ДНК-полимераза III (Pol III). Она обладает полимеразной и 3'→5'-экзонуклеазной активностью; синтезирует лидирующую и отстающую цепь ДНК, обладает корректорской функцией. В клетке содержится 10-20 молекул Pol III, она обладает повышенным сродством к матрице и обеспечивает высокую эффективность копирования. Структура ДНК-полимеразы III приведена на [рис. 29.2](#).

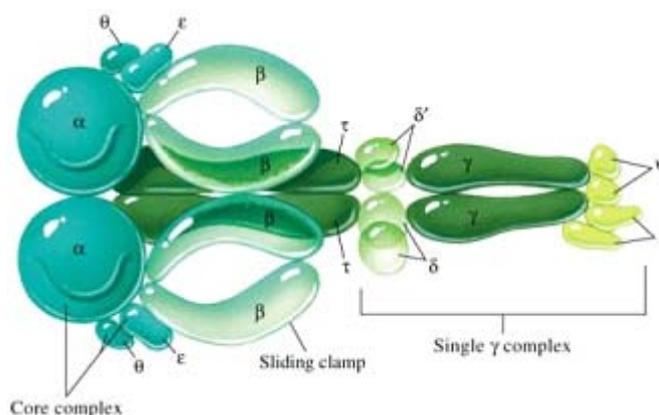
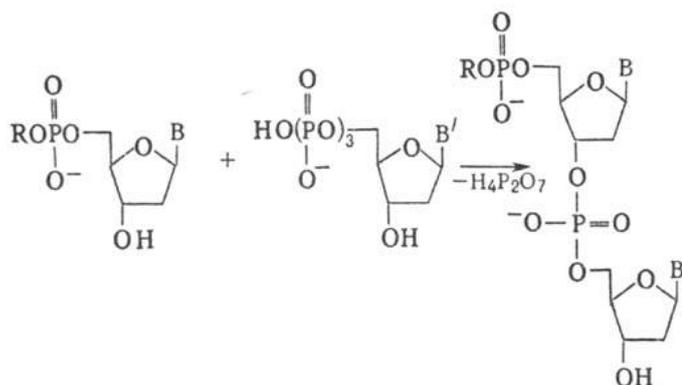


Рис. 29.2. Субъединичная структура ДНК-полимеразы III

Кор-фермент состоит из субъединиц ($\alpha\theta\epsilon$), β -белок выполняет функцию «скользящего зажима», τ -белок участвует в сборке и димеризации холофермента ДНК-полимеразы. γ -комплекс ($\gamma, \delta, \delta', \chi, \psi$) – ДНК-зависимая АТРаза, необходим для связывания затравки с матрицей и активации ДНК-полимеразы.

ДНК-полимеразы – это полидезоксирибонуклеотид-синтетазы, ферменты класса трансфераз, катализирующие образование фосфодиэфирной связи при синтезе ДНК: R-цепь ДНК, В, В'-азотистые основания:



Имеются доказательства того, что в димерной форме ДНК-полимераза III катализирует сопряженный синтез ведущей (лидирующей) и отстающей цепей ДНК при репликации. ДНК-полимеразы нуждаются в затравке (праймере), поскольку они могут присоединять дезоксирибонуклеотиды только к 3'-ОН-группе.

Топоизомеразы участвуют в процессе раскручивания двойной спирали в репликативной вилке. Эти ферменты изменяют степень сверхспирализации и приводят к образованию «шарнира», который создает условия для непрерывного движения репликативной вилки. Идентифицированы два типа топоизомераз: топоизомеразы I типа надрезают одну из двух цепей ДНК, в результате чего концевой участок двойной спирали может повернуться вокруг интактной цепи, и затем воссоединяют концы разрезанной цепи. Топоизомеразы типа II вносят временные разрывы в обе комплементарные цепи, изменяют степень сверхспирализации, а затем соединяют разорванные концы. Топоизомеразы помогают хеликазе раскручивать ДНК для ее репликации.

Хеликазы (от лат. *helix* - спираль, белок *dnaB*), осуществляют образование и продвижение вдоль спирали ДНК репликативной вилки – участка молекулы с расплетенными цепями. Эти ферменты для расплетения цепей используют энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ. Хеликазы действуют в комплексе с *ssb*-белками, которые связываются с одноцепочечными участками молекулы и тем самым стабилизируют расплетенный дуплекс.

Праймазы. Репликация ДНК требует РНК-праймеров. РНК-праймеры синтезируются праймазой (рис. 29.3), кодируемой *dnaG* геном.

Из рис 29.3 видно, что праймаза состоит из трех доменов:

- – N-терминальный домен (110 аминокислот), содержит ДНК-связывающий мотив -цинковый палец;
- – коровый (центральный) домен (322 аминокислоты) содержит каталитический центр;
- – С-терминальный домен (151 аминокислота), взаимодействующий с *dnaB*.

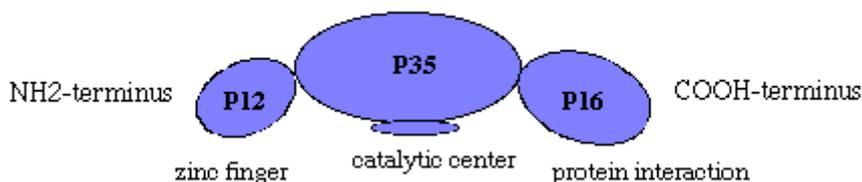


Рис. 29.3. Праймаза *E.coli*

Праймеры, синтезируемые праймазой *E.coli*, начинаются с последовательности rrrAG на 5'-конце и состоят примерно из 10-12 нуклеотидов. Праймазы различаются как по структуре, так и по специфичности действия.

ДНК-лигазы катализируют процессы воссоединения фрагментов цепей ДНК, участвуя в образовании ковалентных связей между 5'-P- и 3'-ОН-группами соседних дезоксирибонуклеотидов. Эти ферменты также используют энергию макроэргических связей, образуемую при гидролизе АТФ.

В [таблице 29.1](#) сведены основные функции ферментов и белков, участвующих в процессе репликации.

Таблица 29.1

Функции белков и ферментов, участвующих в репликации

Белки, ферменты	Основная функция
ДНК-полимераза	Полимеризация дезоксирибонуклеотидов
Хеликаза	Раскручивание цепей ДНК
Топоизомераза	Релаксация положительной сверхспирализации
Праймаза	Синтез РНК-праймера
Белок ssb	Препятствуют обратной рекомбинации расплетенных цепей в двойной спирали
ДНК-лигаза	Соединяет фрагменты Оказаки на отстающей цепи

Репликация ДНК идет в три стадии: инициация, элонгация и терминация.

У бактерий инициация репликации ДНК начинается в уникальном сайте хромосомы, точке репликации – *oriC*, из которой репликация осуществляется двунаправлено до точки окончания (*terminus*). В результате образуются две репликативные вилки, которые продвигаются в противоположных направлениях, т. е. обе цепи реплицируются одновременно.

Инициаторный белок *dnaA* связывается с повторяющимися сайтами связывания на *oriC*, образуя специализированную нуклеопротеиновую структуру. Это приводит к локальному расхождению АТ-богатой последовательности *oriC*, которая служит зоной связывания для репликативной хеликазы (*dnaB*), и белка *dnaC* ([рис. 29.4](#)).

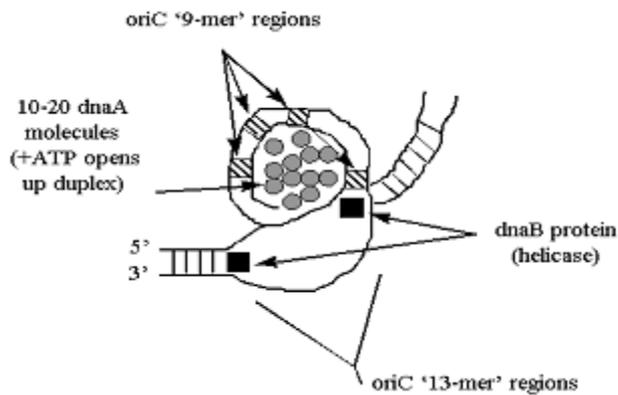


Рис.29.4. Инициация репликации ДНК

Далее *dnaB* активируется удалением *dnaC*, движется на определенное расстояние в направлении 5' → 3' и взаимодействует с праймазой *dnaG*. Праймаза синтезирует короткие РНК-праймеры для холофермента ДНК-полимеразы III.

В месте инициации образуется промежуточный комплекс, состоящий по меньшей мере из пяти белков. Один из них – белок *dnaB* – может передвигаться вдоль ДНК, используя энергию гидролиза АТФ, а также служит сигналом для активации праймазы (рис. 29.5).

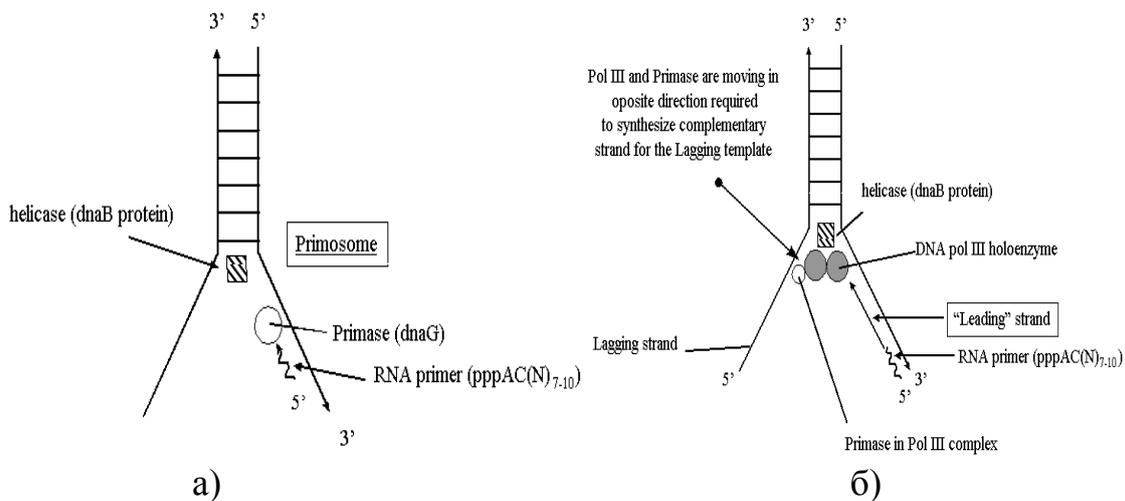


Рис. 29.5. Образование репликативной вилки и праймера на лидирующей цепи ДНК (а); переход Pol III вместе с праймазой на отстающую цепь ДНК

Праймаза является компонентом праймосомы, состоящей из нескольких различных субъединиц. В состав праймосомы входит также комплекс белков *DnaB* и *DnaC*, который вблизи репликационной вилки периодически участвует в формировании специфической вторичной структуры ДНК, подходящей для узнавания праймазой.

Инициация репликации ДНК заканчивается образованием репликативной вилки и синтезом РНК-затравки на лидирующей цепи ДНК (рис.29.5) благодаря формированию репликационного комплекса (рис.29.6).

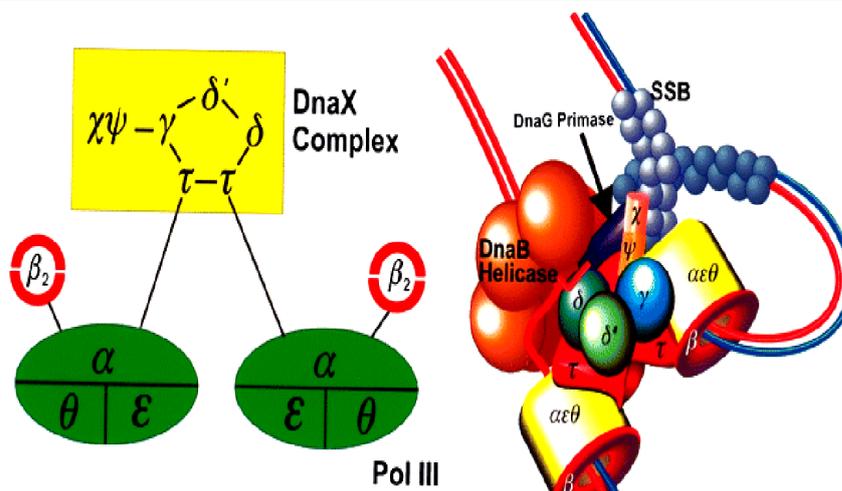


Рис.29.6. Репликационный комплекс *E.coli*

В процессе элонгации происходит наращивание дочерних полинуклеотидных цепей ДНК. Каждая репликативная вилка включает, по крайней мере, две молекулы ДНК-полимеразы III, ассоциированные с несколькими вспомогательными белками. К последним относятся ДНК-топоизомеразы (гиразы), которые раскручивают плотно свернутую двойную спираль ДНК, и хеликазы, которые расплетают двухтяжевую ДНК на две цепи.

Ведущая цепь ДНК реплицируется непрерывно в направлении, совпадающем с движением репликативной вилки. Отстающая цепь считывается в направлении, противоположном движению репликативной вилки. Преодоление антипараллельности цепей ДНК при репликации, возможно, достигается путем образования петельной структуры (рис. 29.7).

Вначале на отстающей цепи синтезируются короткие фрагменты новой цепи ДНК, так называемые фрагменты Оказаки, названные так по имени их первооткрывателя. Каждый фрагмент начинается с короткой РНК-затравки (праймера), необходимой для функционирования ДНК-полимеразы. ДНК-полимераза III достраивает этот праймер до фрагмента ДНК длиной 1000-2000 дезоксирибонуклеотидных звеньев.

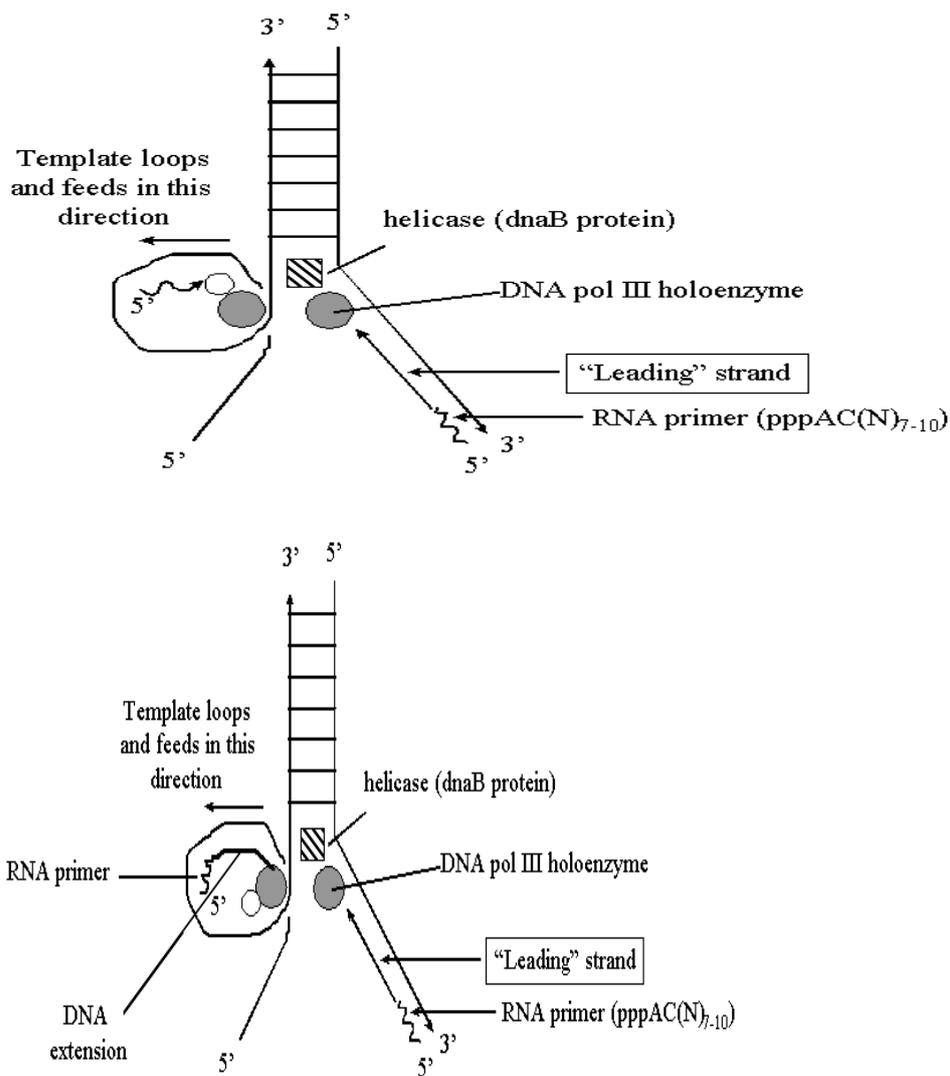


Рис.29.7. Гипотетический механизм преодоления антипараллельности цепей ДНК

Кроме полимеризации цепей, которую осуществляет Pol III, в ходе элонгации ДНК происходят следующие события:

1) вырезание РНК-праймеров из лидирующей цепи и из каждого фрагмента Оказаки. Эту функцию выполняет Pol I, благодаря 5'→3'-экзонуклеазной активности;

2) заполнение брешей, оставшихся после удаления праймеров. В этом процессе участвует также ДНК-полимераза I, используя для встраивания нуклеотидов 3'-ОН-группу соседнего фрагмента Оказаки (рис. 29.8);

3) соединение фрагментов ДНК в отстающей цепи с помощью фермента ДНК-лигазы;

4) исправление ошибок репликации, благодаря 3'→5'-экзонуклеазной активности, которой обладают как Pol III, так и Pol I.

рое должно быть на этом месте (правильное основание). Скорость точной репликации у бактерий примерно 500 оснований в секунду, а у высших клеток, включая клетки человека, около 50 оснований в секунду.

Репликация ДНК у эукариот

ДНК хромосом высших клеток намного длиннее, а сами хромосомы устроены намного сложнее, чем маленькие и простые бактериальные геномы. У высших клеток, в отличие от бактерий, ДНК в хромосомах образует комплекс с белками (гистонами), которые участвуют в сворачивании длинных нитей ДНК в серию петель для того, чтобы их можно было упаковать внутри ядра. Репликация ДНК начинается одновременно в нескольких сайтах каждой хромосомы. У эукариот число их может превысить 1000, поэтому большой набор ДНК-последовательностей реплицируется за 5-20 часов. Из каждой такой точки в противоположных направлениях одновременно движутся две репликативные вилки. Репликация продолжается до полного завершения синтеза дочерних цепей и разделения новых дуплексов. У млекопитающих и человека известно пять разных ДНК-полимераз. Репликативный синтез ДНК катализируют две ДНК-полимеразы (α и δ); β - и ϵ -полимеразы участвуют в репарации ДНК, γ -полимераза – в репликации митохондриальной ДНК. Поскольку эукариотическая ДНК линейна, при репликации из-за вырезания праймеров на концах полинуклеотидных цепей образуются недореплицированные участки. Их репликация осуществляется с помощью особого фермента – теломеразы (рис. 29.10).

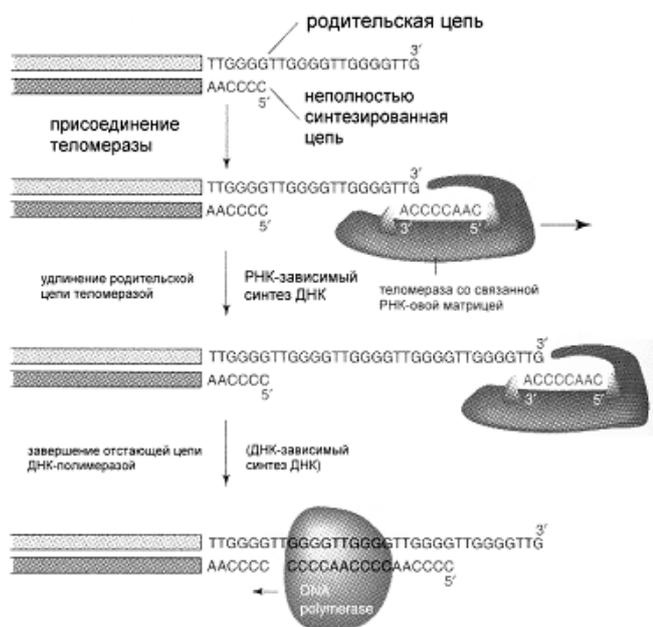


Рис. 29.10. Репликация теломерных участков хромосом

Теломераза, содержащая в себе последовательность нуклеотидов, за несколько приемов удлиняет укороченную цепь, создавая пространство для

работы праймазы и ДНК-полимеразы, после чего избытки нуклеотидов удаляются:

Репаративный синтез ДНК

Воздействие на организм неблагоприятных факторов (химические соединения, ультрафиолетовое излучение и др.) приводит к постоянному накоплению ошибок в геноме, которые в конечном итоге вызывают появление патологии, в частности, – невыясненный до сих пор механизм раковых заболеваний. Пока лишь существуют только предположения о том, что причиной раковых заболеваний являются дефекты в носителях информации – ДНК.

Возможны, как минимум, четыре типа повреждений ДНК:

- 1) повреждение одиночных оснований (жезаминирование цитозина в урацил, аденина в гипоксантин; алкилирование оснований; включение аналогов оснований, инсерции и делеции нуклеотидов и др.);
- 2) повреждение пары оснований, например, индуцированное ультрафиолетовым излучением образование тиминовых димеров;
- 3) разрывы цепей при действии ионизирующей радиации;
- 4) образование перекрестных связей между основаниями, а также между ДНК и белками, например, гистонами.

На [рис. 29.11](#) показано образование пиримидиновых димеров при воздействии ультрафиолетовых лучей..

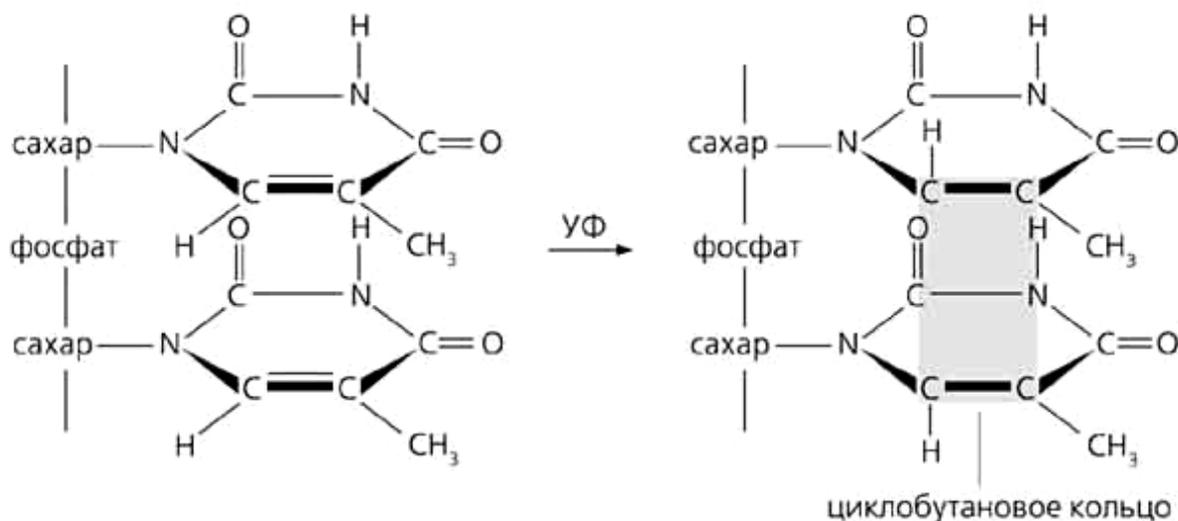


Рис.29.11. Образование тиминовых димеров в ДНК при ультрафиолетовом облучении

ДНК с таким нарушением уже не может нормально работать. С нее теперь невозможно считать информацию, необходимую для производства белков, или снять копию. Следовательно, процессы жизнедеятельности клетки нарушаются, а деление ее останавливается. Ферменты, ответственные за ко-

пирование ДНК и считывание с нее информации, дойдя до тиминового димера, либо «перепрыгнуть» через него, что приведет к разрыву синтезируемого белка на две части, либо вовсе остановятся.

В случае такого повреждения репарация начинается с того, что специальный белок, УФ-эндонуклеаза, находит тиминный димер и рядом с ним разрывает цепь ДНК (рис. 29.12).

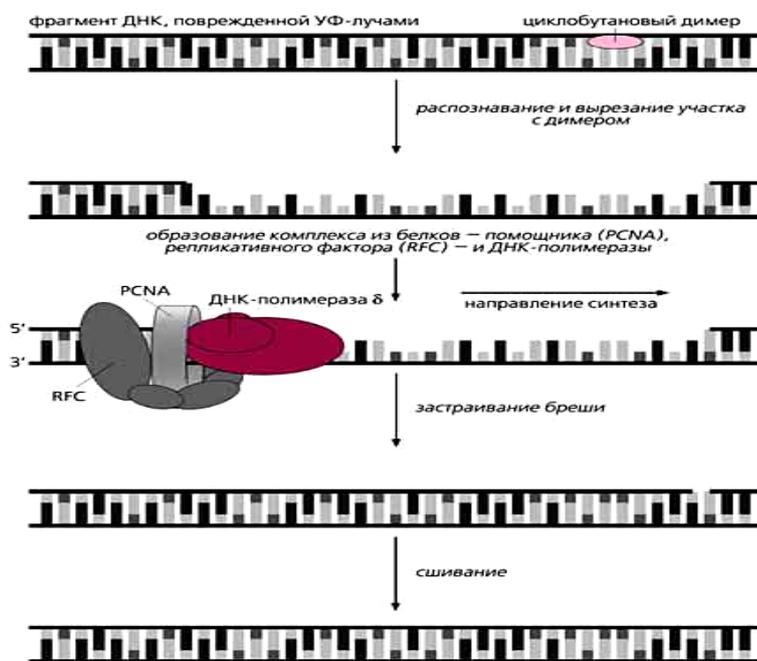


Рис.29.12. Репарация тиминных димеров

При этом вторая цепь остается целой. Затем в работу включается другой белок – экзонуклеаза. Она, отщепляя по одному, удаляет по обе стороны от разрыва несколько сотен нуклеотидов. В результате на цепи ДНК (там, где был обнаружен тиминный димер) возникает брешь длиной в несколько тысяч нуклеотидов. Эту брешь теперь быстро заделывает третий белок – ДНК-полимераза I (у прокариот) или ДНК-полимераза δ (у эукариот). По принципу комплементарности и на основе информации о второй, нетронутой цепочке ДНК, полимеразы встраивают нуклеотиды в первую цепочку. Завершающий этап осуществляет ДНК-лигаза. Она устраняет разрывы на репарированной цепочке ДНК. В результате структура ДНК полностью восстанавливается.

Лекция 30

Транскрипция (биосинтез РНК)

Транскрипцией называют биосинтез РНК на матрице ДНК. Транскрипция является начальной стадией реализации генетической информации, в процессе которой информация с определенных участков ДНК «переписыва-

еся» в комплементарные одноцепочечные молекулы РНК. В результате образуют-	Нематричная (кодирующая цепь)	TACGGATA	ся
мРНК,			коди-
рующие	Матричная цепь	ATGCCTAT	амино-
кислот-			ные по-
следо-			ватель-

ности белков, а также тРНК, рРНК и другие виды РНК, выполняющие структурную, регуляторную и каталитическую функции. Основой транскрипции является фундаментальный принцип комплементарности азотистых оснований полинуклеотидных цепей ДНК и РНК.

В отличие от репликации ДНК, тесно связанной с клеточным делением, транскрипция ЛНК происходит практически во всех ядродержащих клетках, как делящихся, так и неделящихся.

Процесс транскрипции осуществляется ферментами ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, которые, как и ДНК-полимеразы, являются нуклеотидилтрансферазами, в качестве субстратов использующими нуклеозид-5'-трифосфаты. РНК-полимеразы проявляют активность только в присутствии ионов Mg^{2+} . В отличие от ДНК-полимераз, РНК-полимеразы не нуждаются в праймере и в качестве субстратов используют рибонуклеозид-5'-трифосфаты (АТР, ГТР, СТР, УТР). Как и при синтезе ДНК, в ходе включения рибонуклеозид-трифосфатов в строящуюся цепь они теряют пирофосфатные остатки. Это обеспечивает процесс энергией; поэтому дополнительных ее источников не требуется.

Рост полинуклеотидной цепи идет в направлении $5' \rightarrow 3'$. Это означает, что рибонуклеозид-5'-трифосфаты присоединяются к 3'-ОН группе рибозы предшествующего нуклеотида. У бактерий один фермент синтезирует все виды РНК, у эукариот разные виды РНК синтезируются различными РНК-полимеразами.

Обычно транскрибируется только одна из комплементарных цепей ДНК; следовательно, для транскрипции характерна асимметричность процесса. Неясно, каким образом осуществляется выбор нужной цепи. Видимо, ключевую роль играют какие-то последовательности нуклеотидов на одной из цепей, узнаваемые РНК-полимеразой. Транскрибируется матричная цепь ДНК. Другая цепь называется кодирующей (смысловой), поскольку ее последовательность идентична последовательности РНК. При этом необходимо помнить о том, что вместо основания Т (тимин) в РНК включается основание У (урацил).

Например, в ДНК:

РНК, синтезируемая на основе этого участка:

UACGGAUA

Видно, что синтезированная РНК комплементарна матричной цепи ДНК и идентична кодирующей цепи ДНК.

Для транскрипции характерна консервативность процесса. Молекула ДНК по окончании синтеза РНК возвращается в исходное состояние. При синтезе же ДНК молекулы наполовину обновляются.

Как у про-, так и у эукариот одновременно транскрибируется не вся молекула ДНК, а только ее определенные участки □ транскриптоны. В транскриптоне присутствуют последовательности, одна из которых называется промотором (зона начала транскрипции), а другая □ терминатором (зона остановки транскрипции). Транскриптоны бактерий называют оперонами. Опероны, как правило, включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие структуру нескольких белков, называемых структурными генами (цистронами). Поэтому бактериальные мРНК являются полицистронными, в отличие от моноцистронных мРНК высших организмов.

Транскрипция у прокариот

Бактериальные РНК-полимеразы □ сложные белки, состоящие из нескольких типов субъединиц. Холофермент *E.coli* содержит 5 разных субъединиц: 2 α -субъединицы, β -, β' -субъединицу, σ - и ω -субъединицы. Альтернативная форма фермента, лишенная σ -субъединицы, называется мини-ферментом или кор-ферментом. Он способен транскрибировать ДНК в РНК, однако не может инициировать синтез РНК в нужном месте, поскольку не способен узнавать промоторные сайты. Точное связывание и инициация в промоторах происходят только после добавления к кор-ферменту σ -субъединицы и образования холофермента ([рис. 30.1](#)).

Транскрипция аналогична репликации в том смысле, что порядок присоединения рибонуклеотидов определяется комплементарным спариванием оснований. После формирования первых нескольких фосфодиэфирных связей (обычно 5-10) σ -субъединица отделяется от иницирующего комплекса, а дальнейшая транскрипция осуществляется с помощью кор-фермента.

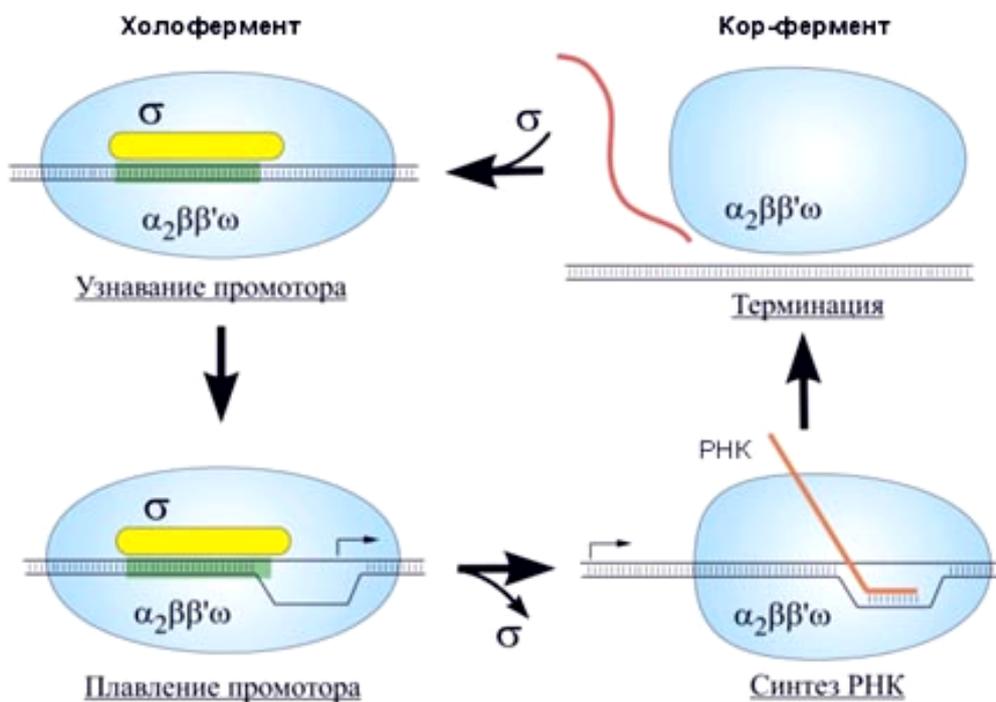


Рис. 30.1. Общая схема транскрипционного цикла

Как и другие матричные процессы, транскрипция включает три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация транскрипции

На этом этапе транскрипции необходимы холофермент, специальная последовательность нуклеотидов в ДНК (промотор) и набор нуклеозидтрифосфатов. Транскрипция иницируется при образовании стабильного комплекса между холоферментом и промотором, расположенным в начале всех транскрипционных единиц.

Промотор — это участок молекулы ДНК, состоящий примерно из 40 пар нуклеотидов и расположенный непосредственно перед участком инициации транскрипции. В нем различают две важные и достаточно консервативные по составу последовательности. Одна из них состоит из шести или семи нуклеотидов (чаще ТАТААТ) и расположена на расстоянии примерно 10 нуклеотидов от первого транскрибируемого нуклеотида (+1); эту последовательность обычно обозначают как -10 -последовательность, или Прибнов-бокс, (в честь ее первооткрывателя Прибнова). В данном сайте РНК-полимераза связывается с ДНК. Вторая последовательность расположена на расстоянии примерно 35 нуклеотидов до сайта инициации (-35) и служит участком распознавания промотора РНК-полимеразой ([рис. 30.2](#)).

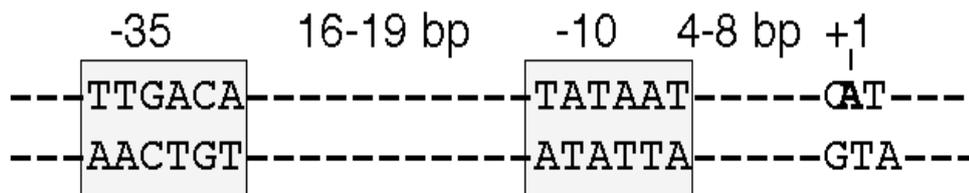


Рис.30.2. Структура промотора у прокариот

Когда РНК-полимераза связывается с промотором, происходит локальное расплетение двойной спирали ДНК и образование открытого промоторного комплекса (рис. 30.3), так называемого транскрипционного «глазок». Благодаря этому нуклеотиды матричной цепи ДНК в области «глазка» становятся доступными для спаривания с рибонуклеозид-трифосфатами.

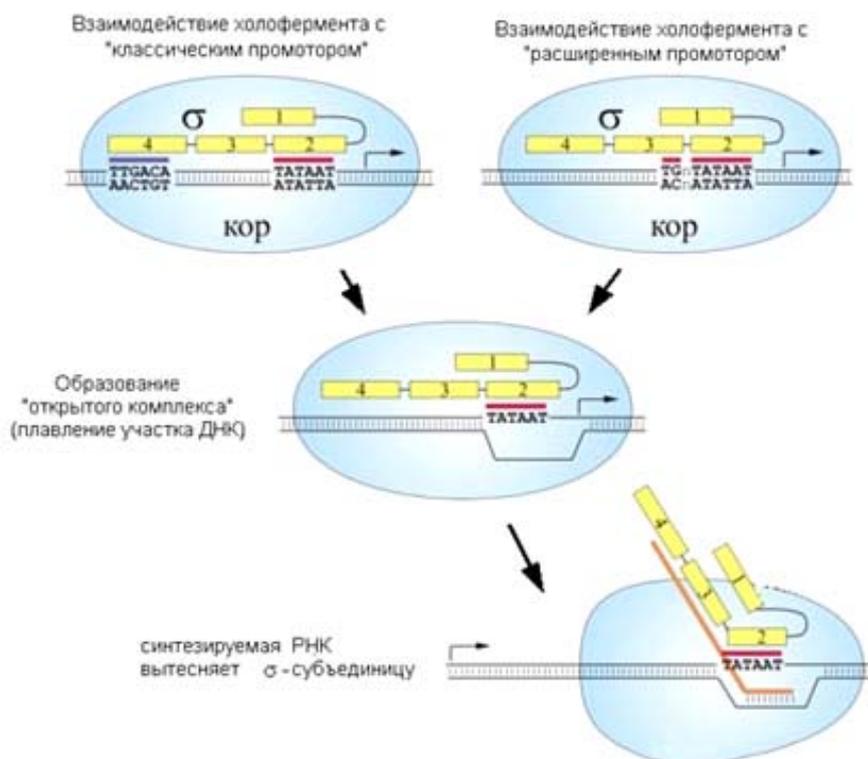


Рис. 30.3. Схема инициации транскрипции

Происходит копирование последовательности смысловой, или (+)-цепи ДНК, имеющей направление $5' \rightarrow 3'$. При этом первым в строящуюся цепь РНК всегда включается пуриновый нуклеотид \square АТР или ГТР, сохраняющий все три его фосфатных остатка. Затем образуется первая $5',3'$ -фосфодиэфирная связь. Далее σ -субъединица теряет связь с ферментом, а кор-фермент начинает перемещаться по ДНК.

Элонгация транскрипции

Растущая цепь РНК остается связанной с ферментом и спаренной своим растущим концом с участком матричной цепи. Остальная часть образовавшейся цепи не связана ни с ферментом, ни с ДНК. По мере продолжения транскрипции кор-фермент, движущийся вдоль цепи ДНК, действует подобно застёжке «молния», расплетая двойную спираль, которая замыкается позади фермента, и восстанавливается ее исходная дуплексная структура. «Раскрытая» ферментом область ДНК простирается всего на несколько нуклеотидов (рис. 30.4).

Наращивание РНК идет в направлении от 5'-к 3'-концу вдоль матричной (3'-) цепи, ориентированной в направлении 3'→5', т.е. антипараллельно. РНК наращивается на 3'-конце. В ходе присоединением каждого нуклеотида кор-фермент делает шаг по ДНК и сдвигается на один нуклеотид. Размер белкового комплекса, составляющего кор-фермент, 150 Å. Размеры РНК-полимеразы – 150×115×110Å.

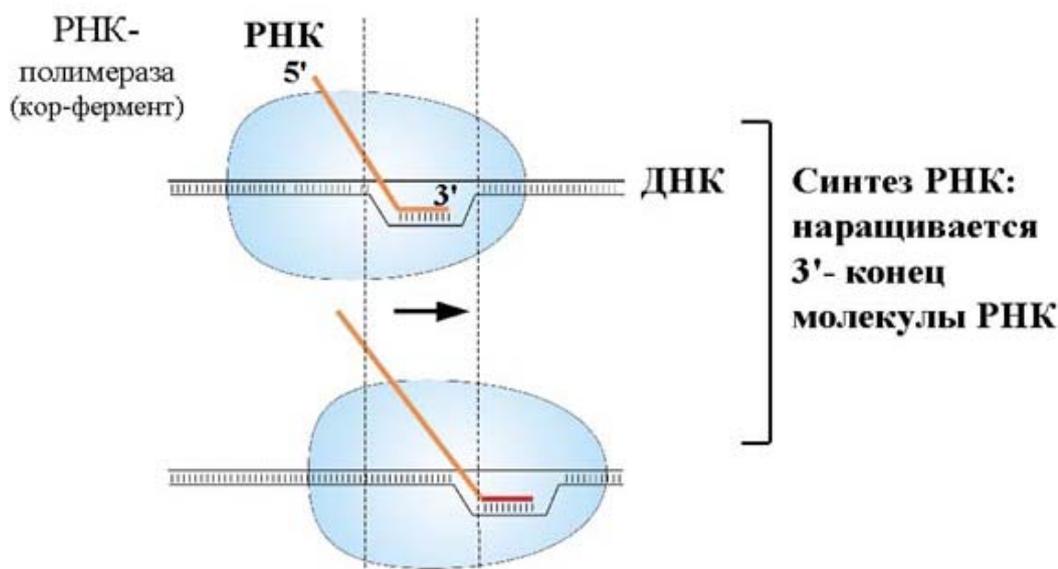


Рис. 30.4. Элонгация транскрипции

Скорость работы РНК-полимеразы – до 50 нуклеотидов в секунду. Комплекс кор-фермента с ДНК и РНК называется элонгационным комплексом. В нем находится ДНК-РНК гибрид. Это участок, на котором ДНК спарена с РНК и 3'-конец РНК открыт для дальнейшего роста. Размер этого гибрида – 9 пар оснований. «Расплетенный» участок ДНК занимает примерно 12 пар оснований.

Перед «расплетенным» участком РНК-полимераза связана с ДНК. Этот участок называется передним дуплексом ДНК, его размер – 10 пар оснований. Полимераза связана также с более длинной частью ДНК, называемой задним дуплексом ДНК. Размер матричных РНК, которые синтезируют РНК-полимеразы у бактерий, может достигать 1000 нуклеотидов и больше. В зу-

кариотических клетках размер синтезируемых ДНК может достигать 100000 и даже нескольких миллионов нуклеотидов. Правда, неизвестно, существуют ли они в таких размерах в клетках, или в процессе синтеза могут успеть процессировать.

Элонгационный комплекс довольно стабилен, т.к. должен выполнить большую работу (рис. 30.5). Он способен перемещаться по ДНК со скоростью до 50 нуклеотидов в секунду. Этот процесс называется перемещением (или транслокацией). Взаимодействие ДНК с РНК-полимеразой (корферментом) не зависит от последовательности этой ДНК, в отличие от σ -субъединицы. При прохождении определенных сигналов терминации корфермент завершает синтез ДНК.

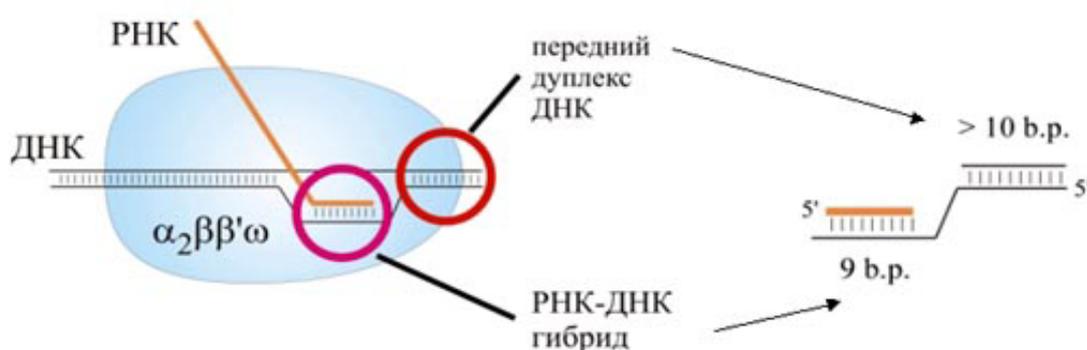


Рис.30.5. Элонгационный комплекс

Терминация транскрипции

Последовательности ДНК, являющиеся сигналами к остановке транскрипции, называются транскрипционными терминаторами. Они содержат инвертированные повторы (GC-богатые участки), благодаря чему 3'-концы РНК-транскриптов складываются с образованием шпилек разной длины. Поскольку сила взаимодействия пар G-C велика, локальная денатурация таких участков в ДНК затруднена. Это замедляет продвижение РНК-полимеразы и может служить для нее сигналом к прекращению транскрипции.

Обнаружены два типа сигналов терминации: ρ -зависимый и ρ -независимый терминаторы (ρ — это олигомерный белок, прочно связывающийся с РНК и в этом состоянии гидролизующий АТФ до АДФ и неорганического фосфата).

В одной из моделей действие ρ -белка объясняется тем, что он связывается с синтезируемой цепью РНК и перемещается вдоль нее в направлении 5' → 3' к месту синтеза РНК, необходимая для перемещения энергия выделяется при гидролизе АТФ (рис. 30.6).

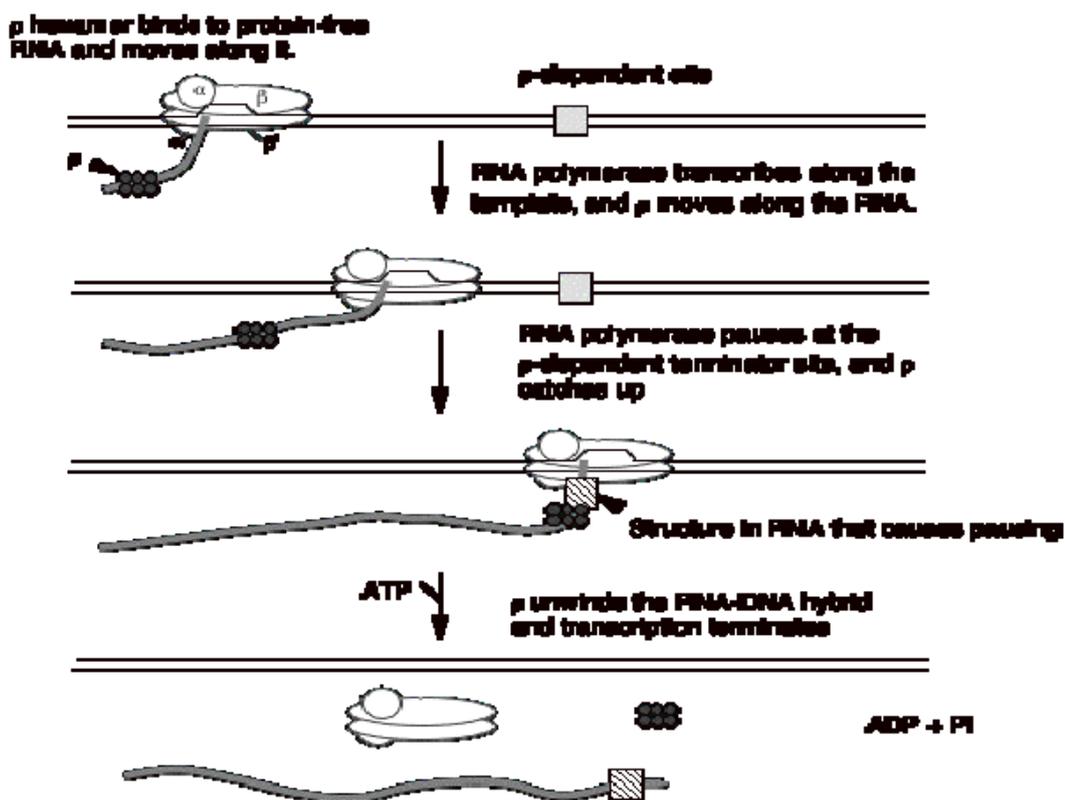


Рис.30.6. Механизм ρ -зависимой терминации транскрипции

При этом ρ -белок наталкивается на образующуюся в РНК «шпильку» и останавливает полимеразу, которая могла бы продолжить транскрипцию. Механизм ρ -независимой терминации изучен хуже, в нем остается много неясного.

Транскрипция у эукариот

РНК-полимеразы эукариот изучены значительно слабее, чем соответствующие ферменты бактерий. Синтез РНК у эукариот осуществляют три различных фермента: РНК-полимеразы I, II и III. Их структура изучена не полностью. РНК-полимераза I необходима для синтеза 18S-, 5,8S- и 28S-рибосомальных рНК; РНК-полимераза II участвует в синтезе мРНК, некоторых мяРНК; РНК-полимераза III необходима для синтеза 5S рРНК, тРНК и некоторых мяРНК. У эукариот ни одна из РНК-полимераз не способна самостоятельно связываться с промоторами транскрибируемых ими генов. Для этого необходимы специфичные для каждой РНК-полимеразы белковые факторы транскрипции (ТФ-факторы) (рис. 30.7). Механизмы транскрипции у эукариот и прокариот идентичны.

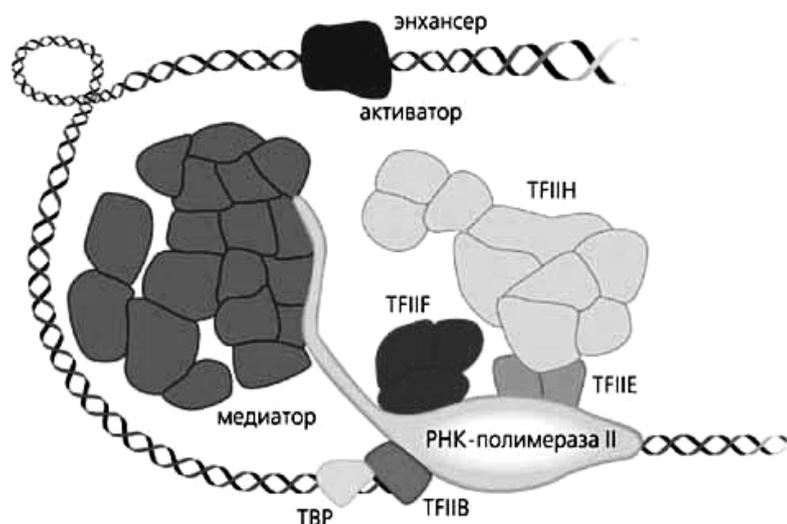


Рис.30.7. Комплекс инициации транскрипции у эукариот

На [рис. 30.7](#) в составе комплекса приведены общие факторы транскрипции (TFIIB, E, F, H и TBP), РНК-полимераза II, медиатор и специфический фактор транскрипции, связанный с энхансером

Процессинг первичных транскриптов РНК

В большинстве случаев первичные транскрипты, образуемые выше-писанным способом, не являются зрелыми молекулами РНК, а требуют процесса созревания, который называется процессингом РНК. У прокариот первичные транскрипты, сформированные при транскрипции генов, кодирующих белки, функционируют в качестве мРНК без последующей модификации или процессинга. Более того, трансляция мРНК часто начинается даже до завершения синтеза 3'-конца транскрипта. Совсем иная ситуация наблюдается для молекул прокариотических рРНК и тРНК. В этом случае кластеры рРНК- или тРНК-генов часто транскрибируются с образованием единой цепи РНК. Для формирования зрелых функциональных форм необходимо специфическое разрезание первичных РНК-транскриптов и их модификация. Эти молекулярные события и называются процессингом РНК (или посттранскрипционной модификацией).

Созревание первичных транскриптов у эукариот осуществляется гораздо сложнее. Первичные транскрипты, так называемые гетерогенные ядерные РНК (гяРНК), по размерам значительно превышают цитоплазматические мРНК, участвующие в трансляции. Это связано с тем, что гяРНК содержат интроны. На первом этапе созревания интроны должны быть удалены из гяРНК. Этот процесс называется сплайсингом (от англ. *to splice* — сплестать, сращивать). После удаления интронов происходит ковалентное соединение участков РНК, которые были транскрибированы с экзонов ([рис. 30.8](#)).

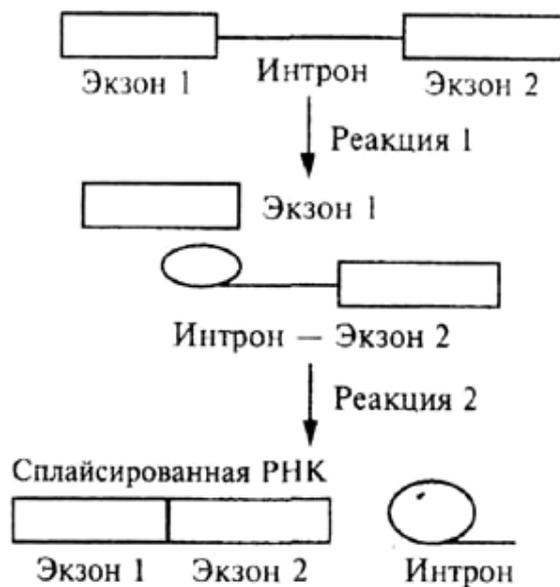


Рис.30.8. Схема сплайсинга РНК

Сплайсинг катализируется нуклеопротеиновым комплексом, сплайсосомой, в состав которой, наряду с белками, входят малые ядерные РНК (мяРНК). Это небольшие по размеру молекулы, характерной особенностью которых является значительное содержание пириμιдинового основания \square урацила ([рис. 30.9](#)).

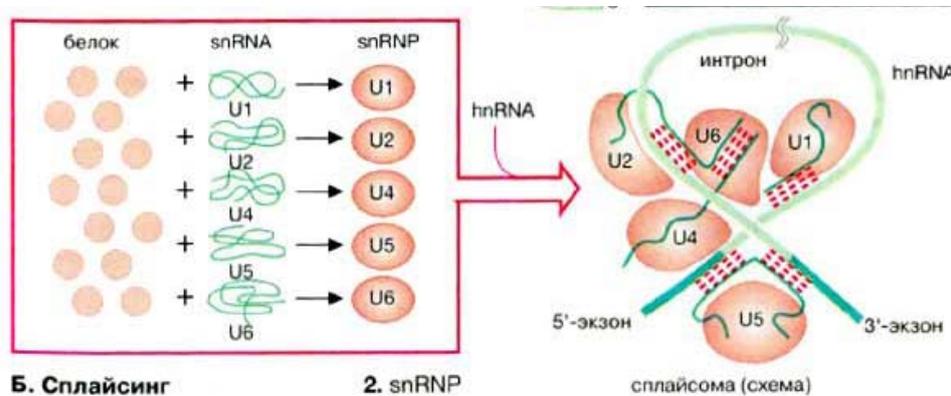


Рис.30.9. Структура сплайсосомы

В первичных транскриптах именно мяРНК катализируют расщепление фосфодиэфирных связей. Именно они являются рибозимами. В сплайсосомах место сплайсинга определяется с высокой точностью, поскольку ошибка даже в один нуклеотид может привести к синтезу функционально неактивного белка. Точное узнавание осуществляется благодаря специфическим нуклеотидным последовательностям (сигналам) на концах интронов.

Кроме сплайсинга, мРНК эукариот подвергается модификации: на 5'-конце синтезируется «кэп» (шапочка) \square структура, представляющая собой метилированный остаток гуанозинтрифосфата, который защищает РНК от гидролиза 5'-экзонуклеазами. На 3'-конце пре-мРНК синтезируется поли-

аденилатная последовательность длиной 150-200 нуклеотидов – «шлейф», поли-А-хвост (см. лекцию 11).

Процессинг прешественников тРНК и рРНК у эукариот осуществляется аналогично таковому у прокариот (рис. 30.10)

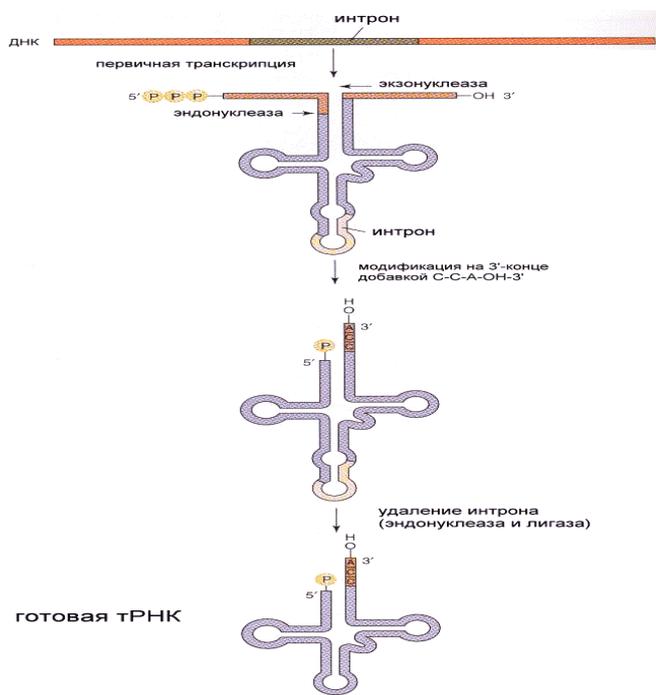


Рис.30.10. Процессинг пре-транспортной РНК

Регуляция генной экспрессии на уровне транскрипции

Клетки имеют механизмы, регулирующие синтез различных белков. Размер хромосомной ДНК в *E.coli* ($4,7 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар) достаточен для кодирования примерно 4000 белков. Однако одновременно синтезируется лишь около 1000 белков. В 46 хромосомах человека число закодированных белков в 100 раз больше, но не все белки постоянно синтезируются. Это означает то, что в клетке биосинтез белков контролируется, причем некоторые белки синтезируются только при определенных условиях.

Белки, синтезируемые с постоянной скоростью, называются конститутивными, белки, синтезируемые со скоростью, резко изменяющейся в зависимости от условий – адаптивными, или индуцибельными.

Конститутивные белки (в том числе и ферменты) содержатся в клетках примерно в постоянном количестве, независимо от того, есть ли в них потребность. Предполагается, что они будут нужны клетке всегда. Поэтому промоторы кодирующих их генов не имеют «выключателя», они всегда находятся в положении «включено». Конститутивными белками являются, например ферменты гликолиза. Количество молекул адаптивных белков варьируется в широких пределах. Очевидно, что синтез конститутивных белков не регулируется, а индуцибельных, напротив, подвергается тонкой регуляции.

Стимуляция биосинтеза белков, сопровождающаяся увеличением их количества, называется индукцией, подавление синтеза белков – репрессией. В клетках имеются вещества, сигнализирующие о состоянии метаболизма внутри клеток или организма. С помощью этих веществ можно «включать» или «выключать» синтез белков. Такими веществами у прокариот могут быть поступающие в клетку питательные вещества и некоторые внутриклеточные регуляторы (циклические нуклеотиды).

Впервые схема регуляции биосинтеза белков у прокариот была предложена французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно в 1961 году. Эта схема была разработана на примере лактозного оперона *E.coli* и получила название механизма индукции – репрессии активности генов. Их идеи были подтверждены в ходе различных генетических и биохимических исследований.

Механизм регуляции активности разных транскриптонов (оперонов) у бактерий выглядит следующим образом. В бактериях имеется группа белков, называемых репрессорами, которые контролируют транскрипцию разных оперонов. Участок ДНК, определяющий структуру белка-репрессора, называется геном-регулятором. Он может быть расположен рядом с опероном, а может располагаться на определенном расстоянии от регулируемого оперона.

Все репрессоры связываются с оператором оперона и блокируют транскрипцию; в этом случае не синтезируются определенные мРНК и не идет синтез соответствующих белков.

Способность связываться с оператором зависит от конформации репрессора, которая может быть активной и неактивной. Только в активной форме репрессор способен образовывать слабые связи с оператором и блокировать синтез мРНК и белка; в неактивной форме он не может соединиться с оператором. Вещества, которые инактивируют репрессор, называются индукторами ([рис. 30.11](#)).

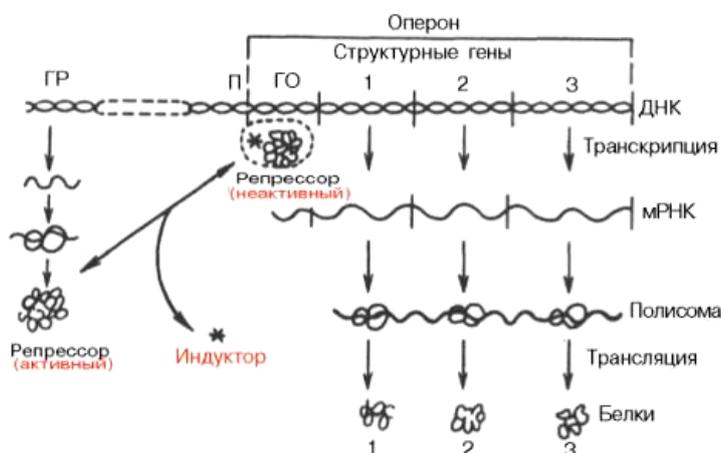


Рис.30.11.Регуляция экспрессии генов путем индукции

Вещества, переводящие его из неактивного состояния в активное, называются корепрессорами. Следовательно, репрессор имеет участок связывания корепрессора и индуктора ([рис. 30.12](#))

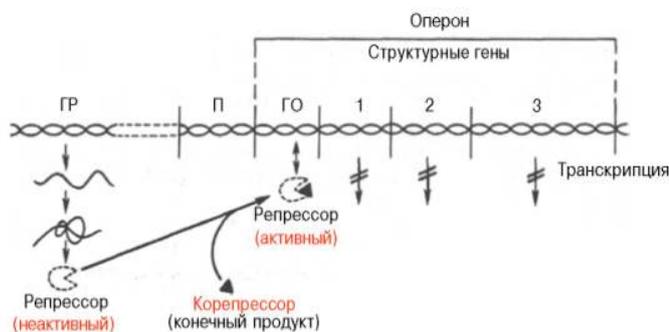


Рис.30.12. Регуляция экспрессии генов пути репрессии

Механизм индукции на примере *Lac*-оперона

Lac-оперон – это группа функционально связанных структурных генов Z, Y и A, несущих информацию о структуре трех ферментов, участвующих в превращении лактозы. Оперон имеет один промотор и один терминатор; поэтому все входящие в него гены транскрибируются в одну полицистронную молекулу мРНК. На мРНК, считанной с *Lac*-оперона, синтезируются различные белки, т.к. как каждый ген обладает собственным сайтом связывания рибосомы. Существует также ген I (I означает индуцибельный), который кодирует белок *lac*-репрессор. Репрессор может связываться с участком ДНК, называемым оператором. Наконец, есть участок ДНК, с которым может связываться белок, являющийся рецептором cAMP. Он назван белком-активатором катаболизма (БАК, CAP) потому, что участвует в индукции и других ферментов, осуществляющих катаболизм субстратов. Организация *Lac*-оперона приведена на [рис. 30.13](#).

В *Lac*-опероне ген Z кодирует фермент β -галактозидазу, участвующую в расщеплении лактозы, ген Y \square β -галактозидпермеазу, необходимую для транспорта лактозы в клетку, ген A \square галактозидтранс ацетилазу (белок A), участвующую в защите клетки от неметаболизирующихся, потенциально токсичных β -галактозидов.

В норме эти три белка синтезируются в течение нескольких минут, но в небольших количествах. Они не нужны клетке до тех пор, пока в среде есть глюкоза. Но как только глюкоза заменяется на лактозу, которая оказывается единственным источником энергии, через 1-2 мин клетки начинают синтезировать β -галактозидазу в больших количествах, достигая уровня, превышающего 1000 молекул на клетку. Теперь *E.coli* может использовать лактозу в качестве источника углерода и энергии. Однако если помимо лактозы есть и глюкоза, клетка не продуцирует указанные выше ферменты. Эта регуляция осуществляется на уровне инициации транскрипции оперона.

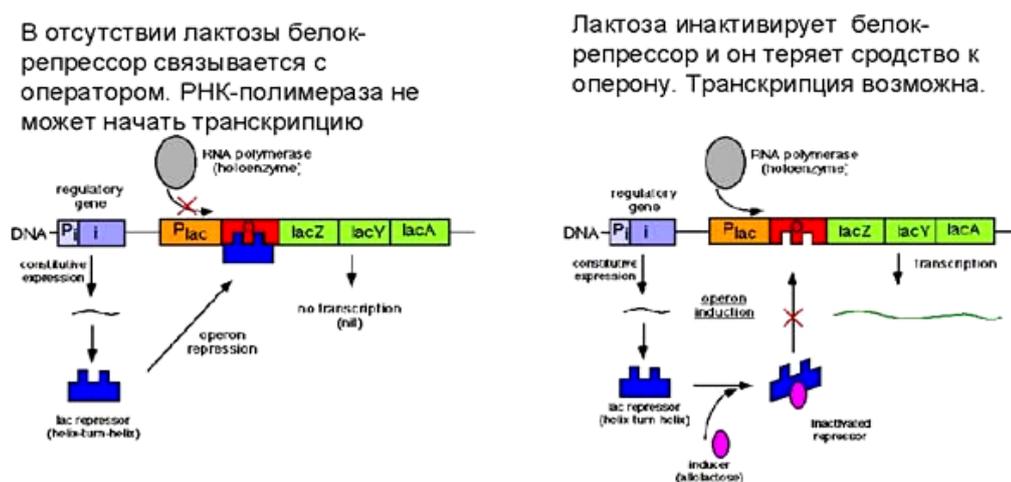


Рис.30.13. Организация и регуляция *Lac*-оперона у *E.coli*

В качестве индуктора *Lac*-оперона выступает лактоза (либо аллолактоза). Белок-репрессор *Lac*-оперона – тетрамер, состоящий из четырех субъединиц с молекулярной массой 37 кДа каждая. Он имеет 2 центра связывания: – один с операторным участком ДНК, другой – с индуктором. Активный белок-репрессор способен связываться с оператором, тем самым не позволяя РНК-полимеразе присоединяться к промотору и начинать транскрипцию *Lac*-оперона.

Если затем индуцированные лактозой клетки *E.coli* перенести на свежую среду, содержащую вместо лактозы глюкозу, транскрипция *Lac*-оперона прекратится. Таким образом, индукция ферментов – это экономичный процесс. Индуцируемые ферменты синтезируются лишь тогда, когда в них возникает потребность. Если один индуктор вызывает синтез группы связанных ферментов или белков, как в данном случае, такой процесс называют координированной индукцией.

E.coli и другие бактерии способны в ответ на различные специфические индукторы синтезировать большое количество разных связанных друг с другом ферментов или их групп. Такая способность позволяет бактериям быстро приспособиться к новым условиям и экономно использовать самые разнообразные питательные вещества, которые появляются в окружающей среде.

В большинстве случаев индуцибельными являются опероны, ответственные за синтез ферментов, катализирующих катаболические реакции (распад аминокислот, сбраживание сахаров и др.). Индукторами таких оперонов, переводящих активный репрессор в неактивное состояние, являются субстраты этих катаболических ферментов.

Катаболитная репрессия

Еще одним способом регуляции *Lac*-оперона является катаболитная репрессия. Ключом к пониманию этого вопроса явились данные о том, что глюкоза понижает концентрацию сАМР в клетках *E.coli*. Затем было обнару-

жено, что экзогенный сАМР снимает состояние репрессии, обусловленное присутствием глюкозы.

Синтезированный в отсутствие глюкозы сАМР связывается с БАК (белковый активатор катаболизма) – белком. Это димер, состоящий из субъединиц с молекулярной массой 22 кДа. Комплекс БАК с сАМР стимулирует транскрипцию, связываясь вблизи от промоторного участка. БАК без сАМР такой способностью не обладает (рис. 30.14).

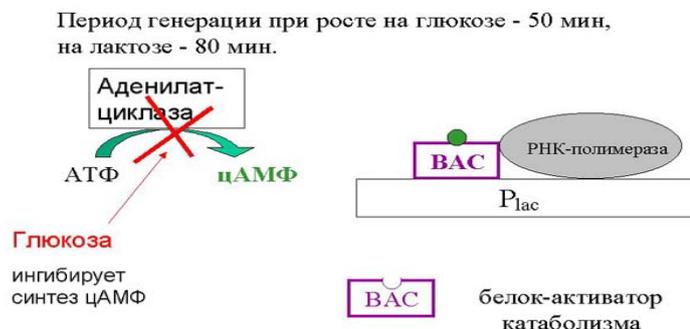


Рис.30.14

. Катаболитная репрессия *Lac*-оперона *E.coli*

БАК стимулирует инициацию синтеза лактозной мРНК в 50 раз. Таким образом, индуцибельные системы контролируются с помощью механизмов, которые используют в качестве сигнальных молекул сАМР и специфические индукторы.

Лекция 31

Трансляция (биосинтез белка)

Трансляция (синтез белка) □ это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с «языка» последовательности нуклеотидов в мРНК «переводится» (транслируется) на «язык» последовательности аминокислот в полипептидной молекуле. Декодирование мРНК в процессе репликации и транскрипции осуществляется в направлении 5′→3′.

Синтез белка протекает в несколько стадий: 1) активация аминокислот; 2) аминоацилирование тРНК; 3) собственно трансляция; 4) посттрансляционная модификация полипептидной цепи.

Для биосинтеза белка необходима информация о структуре синтезируемого белка (она заложена в нуклеотидной последовательности мРНК), рибосомы, транспортных РНК, 20 аминокислот, специфические ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы, осуществляющие активацию аминокислот и присоединение их к тРНК, белковые факторы трансляции, АТР и ГТР, ионы Mg²⁺.

Система активации и транспорта аминокислот в рибосомы

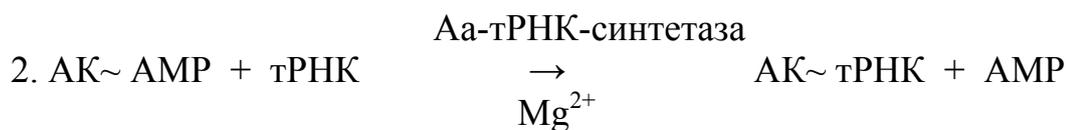
В клетке аминокислоты, как правило, не существуют в свободном виде. Они взаимодействуют с тРНК и сохраняются в виде аминоацил-тРНК (аа-тРНК). Биологический смысл такой мобилизации тРНК заключен в том, что аминокислоты при этом предохраняются от действия катаболических ферментов и не сгорают в клетке, а используются для синтеза белка. Лишь при избытке какой-нибудь из аминокислот часть ее остается не связанной с тРНК и через реакции переаминирования вовлекается в цикл лимонной кислоты для энергетического обмена.

Аминокислота присоединяется ковалентной аминоацильной связью между COOH-группой АК и гидроксильной группой 3'-углеродного атома рибозы к 3'-концевому аденозину ССА-триплета тРНК. Аминоацильная связь является макроэргической, поэтому ее образование можно рассматривать как активирование аминокислоты. В последующем энергия этой связи используется для образования пептидной связи.

Процесс образования аа-тРНК складывается из двух реакций. Первая представляет собой взаимодействие аминокислоты с АТР. В результате этой реакции, катализируемой аа-тРНК-синтетазой и обозначаемой как реакция первичной активации карбоксила (реакция активирования аминокислоты), образуются аминоациладенилат и пирофосфат:



Аминоациладенилат остается связанным с аа-тРНК в виде нековалентного комплекса до тех пор, пока не произойдет вторая реакция: акцептирование активированного аминокислотного остатка, или перенос его на концевую группу тРНК. Эта реакция также катализируется аа-тРНК-синтетазой:



В результате этой реакции карбоксильная группа АК переносится на 3'-ОН группу рибозы концевого аденозина тРНК и образуется конечный продукт – аа-тРНК, а сама аа-тРНК-синтетаза и АМР высвобождаются.

Таким образом, аа-тРНК-синтетазы выполняют исключительно важную роль в реализации генетической информации. С помощью этих ферментов осуществляется специфический отбор аминокислот и «зашифровка», которая заключается в присоединении каждой аминокислоты к специальному адаптеру, способному узнавать кодон для нее на мРНК. Именно на уровне аа-тРНК-синтетаз происходит специфическая подготовка к переводу 4-буквенного генетического кода в 20-буквенный код белков. Ферментативное аминоацилирование тРНК, несомненно, выполняет кодирующую функцию.

Роль тРНК в трансляции

В белоксинтезирующей системе тРНК выполняет следующие три важные функции: а) акцепторную (с помощью специфического фермента аминоацил-тРНК-синтетазы присоединяет на одном из концов своей молекулы соответствующую аминокислоту, в результате чего возникает комплекс аминоацил-тРНК); б) транспортную (доставляет аминокислоту в форме aa-тРНК в рибосому для включения ее в растущую полипептидную цепь); в) адапторную (с помощью своего антикодона специфически взаимодействует с комплементарным ему кодоном мРНК и таким образом обеспечивает необходимую последовательность включения аминокислот в синтезируемую полипептидную цепь в соответствии с программой, заданной мРНК). Благодаря адапторной функции, тРНК «дешифрует» генетический код в РНК-матрице и переводит его в аминокислотный код белка. Реализация всех этих функций возможна благодаря уникальной структуре молекул тРНК (см. лекцию).

Аминоацил-тРНК-синтетазы

Это особый класс ферментов, катализирующих совокупность реакций, составляющих первую стадию биосинтеза белка – строго специфическое соединение аминокислоты с соответствующей ей тРНК. Для каждой АК существует специфическая aa-тРНК-синтетаза. Клетка содержит, по крайней мере, 20 типов aa-тРНК-синтетаз, обладающих специфичностью не только в отношении аминокислоты, но и тРНК. Из-за единообразия функций все тРНК имеют очень сходную пространственную структуру. Поэтому распознавание aa-тРНК-синтетазой своей тРНК должно базироваться на очень тонких различиях строения отдельных тРНК.

Аминоацил-тРНК-синтетазы имеют два активных центра: один небольших размеров, связывающий аминокислоту; и второй, протяженный, □ для точного выбора тРНК. АТФ связывается в активном центре фермента через ион Mg^{2+} с имидазольным радикалом His.

Ферменты, выделенные из одной и той же клетки, но специфичные к разным АК, существенно отличаются по субъединичной структуре и молекулярной массе. Молекулярная масса большинства aa-тРНК-синтетаз составляет примерно 100 кДа, иногда 200 кДа и больше. Эти ферменты являются димерами или тетрамерами, очень редко имеют одну полипептидную цепь, содержащую до 1000 аминокислотных остатков (изолейцил-тРНК-синтетаза, аланил-тРНК-синтетаза). Структура aa-тРНК-синтетаз обеспечивает точную установку тРНК относительно фермента, в результате чего участок aa-тРНК-синтетазы, несущий активированную АК, располагается рядом с 3'-концевым аденозином.

Аминоацил-тРНК-синтетазы работают очень точно: ошибочное аминоацилирование *in vivo* встречается только приблизительно в одном случае из 10000 циклов этой реакции. Именно в виде aa-тРНК аминокислота непосредственно вовлекается в биосинтез белка, осуществляемый белоксинтези-

рующей системой клетки. Аминоацил-тРНК-синтетазы очень медленные ферменты, число их оборотов составляет 50-500 каталитических актов в минуту.

Аминоацил-тРНК-синтетазы делят на два класса: класс I (ферменты, переносящие остаток аминокислоты на 2'-ОН группу рибозы); класс II (ферменты, переносящие остаток аминокислоты на 3'-ОН группу концевой рибозы тРНК).

Аминоацил-тРНК-синтетазы существуют в виде высокомолекулярных комплексов – кодосом. Их молекулярная масса $\approx 1,4$ мДа. Они включают несколько aa-тРНК-синтетаз и ферменты, модифицирующие aa-тРНК-синтетазы и регулирующие их активность. Это протеинкиназы, метилтрансферазы, фосфопроteinфосфатазы и др.

Аминоацил-тРНК-синтетазам свойственны и неканонические функции. В частности, некоторые митохондриальные aa-тРНК-синтетазы проявляют сплайсирующую активность и участвуют в процессинге мРНК. Механизм этого явления неясен.

Как осуществляется узнавание тРНК aa-тРНК-синтетазами? Элементы узнавания тРНК, по-видимому, отличаются у про- и эукариот. Это было показано в экспериментах: многие бактериальные тРНК плохо аминоацилируются aa-тРНК-синтетазами млекопитающих, и наоборот, тРНК млекопитающих служат плохими субстратами для aa-тРНК-синтетаз *E.coli*.

Элементами узнавания у прокариот и дрожжей служат: а) антикодон. (главный элемент узнавания для большинства тРНК); б) Нуклеотиды акцепторного стебля; в) варибельная шпилька (в том случае, если она достаточно длинная).

Нуклеотиды антикодона остаются основными элементами узнавания как в про-, так и в эукариотических системах. В других случаях элементами узнавания служат несколько оснований в разных участках молекулы тРНК.

Активный центр фермента высокоспецифичен в отношении субстрата, но пределы точности все же существуют. Фермент достаточно легко отличает аминокислоты с сильно различающимися свойствами, но ему трудно отличить похожие аминокислоты, например валин и изолейцин.

В случае ошибочного аденилирования изолейцил-специфический фермент гидролизует валил-АМР, в то время как изолейцил-АМР (возможно из-за гораздо больших размеров) в этот центр не входит. Благодаря этому уменьшается ошибка присоединения изолейцина до 1 на 60000. Не все aa-тРНК-синтетазы имеют такой механизм коррекции. Он нужен только для распознавания похожих аминокислот.

Белоксинтезирующая система клетки

В состав белоксинтезирующей системы входят следующие компоненты:

1) рибосомные субъединицы 30S и 50S, образующие у прокариот рибосому 70S, или субъединицы 40S и 60S, образующие у эукариот рибосому 80S;

- 2) мРНК;
- 3) полный комплект аминоксил-тРНК, для образования которых необходимы аминокислоты, аминоксил-тРНК-синтетазы, тРНК и АТФ;
- 4) инициаторная аа-тРНК. У прокариот – формилметионил-тРНК, у эукариот – метеонил-тРНК;
- 5) белковые факторы инициации трансляции. У прокариот – IF-1, IF-2, IF-3, у эукариот 9 факторов: eIF-1, eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D, eIF-5, eIF-6. Для инициации трансляции у эукариот абсолютно необходимы eIF-2, eIF-3 и eIF-5, остальные факторы усиливают функции этих трех;
- 6) белковые факторы элонгации: у прокариот – EF-Tu, EF-Ts, EF-G (Tu, Ts, G), у эукариот – EF-1 (аналог Tu), EF-2 (аналог EF-G);
- 7) белковые факторы терминации (или освобождения): у прокариот – RF-1 (R₁), RF-2 (R₂), RF-3 (S), у эукариот – eRF (для проявления активности ему необходим GTP);
- 8) некоторые другие факторы, еще недостаточно хорошо изученные (факторы диссоциации, ассоциации, высвобождения и др. белки);
- 9) GTP;
- 10) неорганические катионы Mg²⁺ или Ca²⁺ и одновалентные (K⁺ или NH₄⁺) в определенной концентрации.

В ходе синтеза белка информация, закодированная в мРНК, «читается» в направлении от 5'-к 3'-концу, обеспечивая синтез полипептида от N-к С-концу. У прокариот мРНК полицистронна, синтез белка на данной матрице начинается еще до того, как заканчивается процесс транскрипции (транскрипция и трансляция в прокариотических клетках сопряжены в пространстве и во времени). В отличие от прокариот, у эукариот мРНК моноцистронны и каждая мРНК кодирует строение только одной полипептидной цепи. В клетках эукариот синтез белка и транскрипция разобщены. Транскрипция осуществляется в ядре клетки, трансляция – в цитоплазме, куда из ядра поступают «зрелые», функционально активные молекулы мРНК.

Инициация трансляции

Рибосома должна узнать первый триплет кодирующей последовательности и там начать трансляцию. Необходима абсолютно точная инициация, поскольку правильность трансляции мРНК рибосомой зависит от правильной рамки считывания. Если произойдет сдвиг рамки считывания, аминокислотная последовательность полипептида, синтезированного в этом случае, окажется ошибочной, а образовавшийся продукт будет не способен выполнять функции белка, закодированного в данном гене.

В прокариотических клетках инициация трансляции является внутренней. Это означает, что рибосомная 30S-частица присоединяется к участку мРНК, содержащему иницирующий кодон AUG. Не имеет значения, на каком расстоянии от 5'-конца мРНК кодон находится. Для прокариот этот способ инициации трансляции является оптимальным, поскольку он обеспе-

чивает инициацию трансляции сразу нескольких цистронов внутри полицистронных мРНК.

В расположении 30S-субчастицы на мРНК важную роль играет последовательность Шайна-Дальгарно (рис. 31.1), являющаяся элементом 5'-нетранслируемой области прокариотической мРНК. Инициаторной аминоксил-тРНК у прокариот является fMet-тРНК^{fMet}, взаимодействующая антикодоном UAC с кодоном AUG на мРНК по принципу комплементарности.



Рис. 31.1. Присоединение 30S-частицы и fMet-тРНК^{fMet} к мРНК у прокариот

У эукариот инициация трансляции называется терминальной инициацией. В этом случае 40S-частица сначала присоединяется к 5'-концу мРНК, затем движется по мРНК до тех пор, пока не встретит иницирующий кодон. Этот процесс называют сканированием мРНК; он требует затраты энергии и является АТФ-зависимым. В АТФ-зависимом расплетании вторичной структуры мРНК и сканировании ее первичной структуры участвует специальный эукариотический фактор инициации eIF4, обладающий АТФ-азной и хеликазной активностью. Когда рибосомная частица 40S встречается с иницирующим кодоном, антикодон инициаторной Met-тРНК^{Met} взаимодействует с ним и сканирование прекращается (рибосомная частица нашла начало кодирующей последовательности мРНК).

Старт-кодоном в мРНК эукариот также является кодон AUG, но данный триплет может находиться в любой части мРНК, т.к. кодирует аминокислоту – метионин. В связи с этим существуют две различные тРНК, специфичные для метионина. Обе обладают одним и тем же кодоном, но одна используется только для инициации трансляции, а другая – только для включения метионина в процессе элонгации. Инициаторная тРНК имеет структурные особенности, которые распознаются инициаторным белком, или фактором инициации eIF-2, осуществляющим ее доставку к формирующемуся инициаторному комплексу. Met-тРНК, участвующие в элонгации, опознаются другим цитоплазматическим фактором, который и доставляет ее к рибосоме. Этот фактор не связывается с инициаторной Met-тРНК.

В цитоплазме существует фонд свободных 30S- и 50S-субчастиц рибосомы. Белковый фактор IF-3 связывается с 30S-субчастицей и предупреждает реассоциацию рибосомных частиц при инициации трансляции. Этот фактор должен быть высвобожден до того, как 50S-субчастица сможет присоединиться.

Белковые факторы IF-1 и IF-2, связываясь с 30S-субчастицей, участвуют в процессе инициации и освобождаются в цитоплазму, чтобы функционировать вновь в новом акте инициации. Роль IF-1 точно неизвестна, а IF-2 необходим для связывания инициаторной fmet-тРНК^{fmet} ([рис. 31.2](#)).

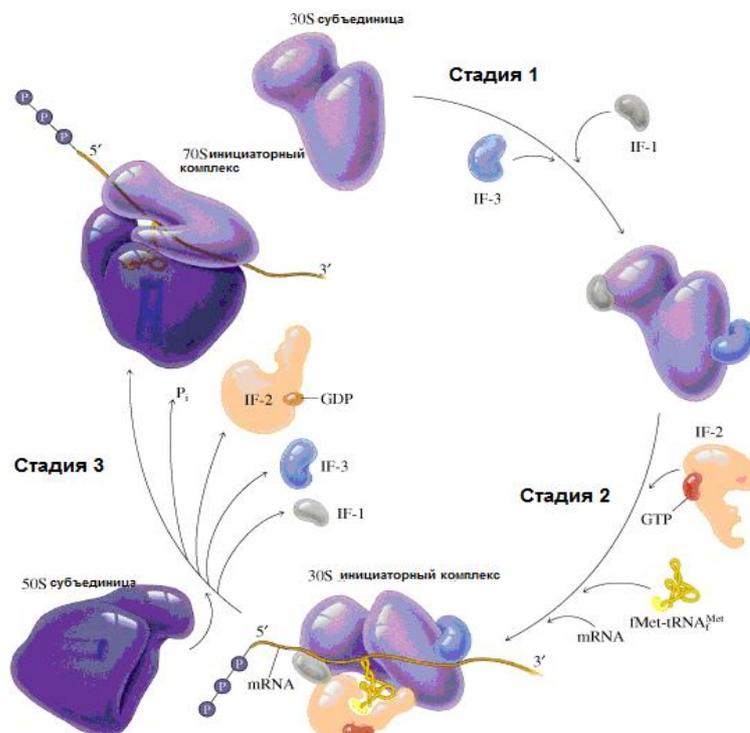


Рис.31.2.Образование иницирующего 70S- комплекса у прокариот

Участки Р и А окончательно формируются только при присоединении 50S-субчастицы. Во время синтеза белка Р-сайт оккупируется молекулой тРНК, на которой находится растущая полипептидная цепь; А-сайт занят аминоацил-тРНК. Растущая полипептидная цепь проходит через туннель на большой субчастице ([рис. 31.3](#)).

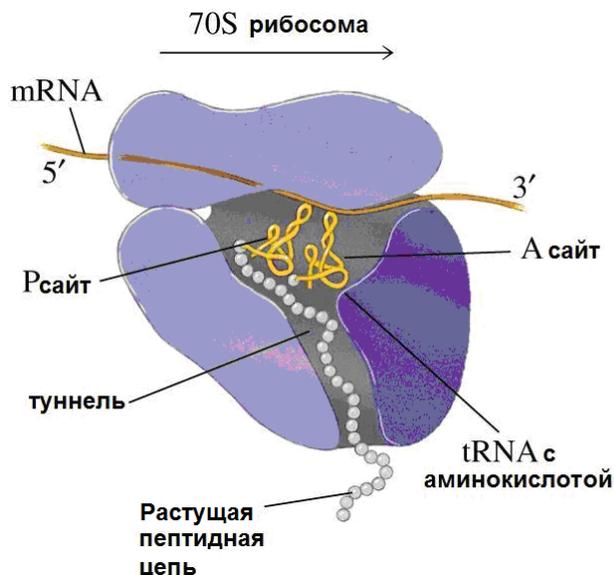


Рис.31.3. 70S- иницирующий комплекс у прокариот
Кроме А-сайта (акцепторного) и Р-сайта (донорного) в 70S-комплексе формируется Е-сайт, с которого уходит деацилированная (без аминокислоты) тРНК (рис. 31.4).

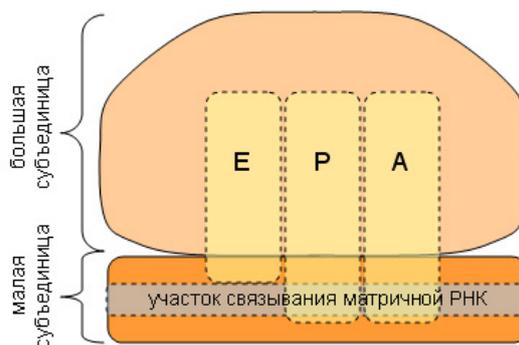
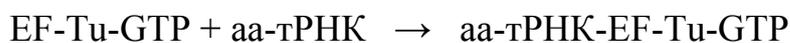


Рис. 31.4. Схема РНК-связывающих участков рибосомы: А □ аминоацил-тРНК-связывающий участок; Р □ пептидил-тРНК-связывающий участок, Е □ участок выхода тРНК (от англ. exit)

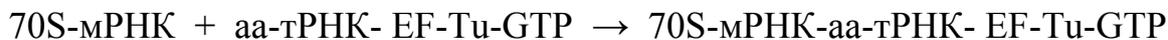
Элонгация трансляции

Выделяются следующие три стадии элонгации трансляции:

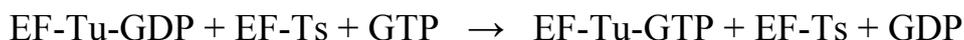
Стадия 1. *Кодонспецифический выбор aa-тРНК*. Требуется обязательного участия белковых факторов Tu, Ts и GTP. Реакции протекают в следующей последовательности. Вначале в результате взаимодействия между белковым фактором EF-Tu и GTP образуется относительно нестабильный комплекс EF-Tu-GTP. Образованный комплекс неспецифически связывает одну молекулу любой aa-тРНК:



Далее происходит связывание aa-тРНК-EF-Tu-GTP на R-участке, которое происходит, вероятно, еще во время предыдущего рабочего цикла рибосомы. Комплекс aa-тРНК- EF-Tu-GTP некоторое время удерживается на участке предварительного узнавания (до переноса на А-сайт). Механизм этого переноса остается неизвестным.



Следующий этап □ гидролиз GTP до GDP, который остается в комплексе с EF-Tu и H₃PO₄. Они высвобождаются из рибосомы. В цитоплазме происходит при участии фактора EF-Ts возвращение EF-Tu-GDP в исходное состояние:



На [рис. 31.5](#) приведен циклический процесс регенерации EF-Tu-GDP.

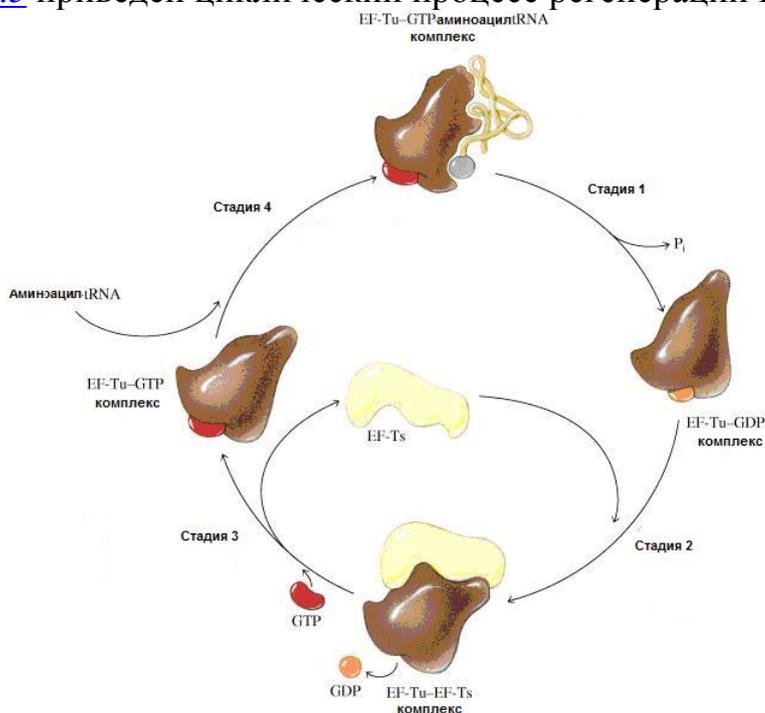


Рис.31.5. Регенерация EF-Tu-GDP в EF-Tu-GTP

Стадия 2. *Транспептидация*. Свободная NH₂-группа aa-тРНК ориентируется рядом с этерифицированным карбоксилем пептидил-тРНК. Такое пространственное сближение субстратов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) является необходимым и достаточным условием образования между ними пептидной связи. Эта реакция катализируется самим ПТЦ. В процессе транспептидации пептидил, связанный через COO-группу с тРНК в донорном центре, покидает свою тРНК (она становится деацилированной) за счет замыкания пептидной связи переносится на NH₂-группу аминокислоты aa-тРНК.

В результате единичной транспептидации пептидил удлиняется на один аминокислотный остаток. Необходимая для этого энергия запасена в сложноэфирной связи пептидила (fmet) и концевго аденозина тРНК (рис. 31.6).

Важным следствием транспептидации является резкое снижение прочности удержания измененных субстратов ПТЦ- деацилированную тРНК в донорном участке и пептидил-тРНК в акцепторном участке, что необходимо для прохождения следующей стадии цикла – транслокации.

Стадия 3. *Транслокация*. После замыкания пептидной связи донорная тРНК, лишившаяся пептидила, занимает донорный участок, а пептидил оказывается связанным с акцепторной тРНК в А-участке. Такое состояние рибосомы и пептидил-тРНК называется претранслоцированным.

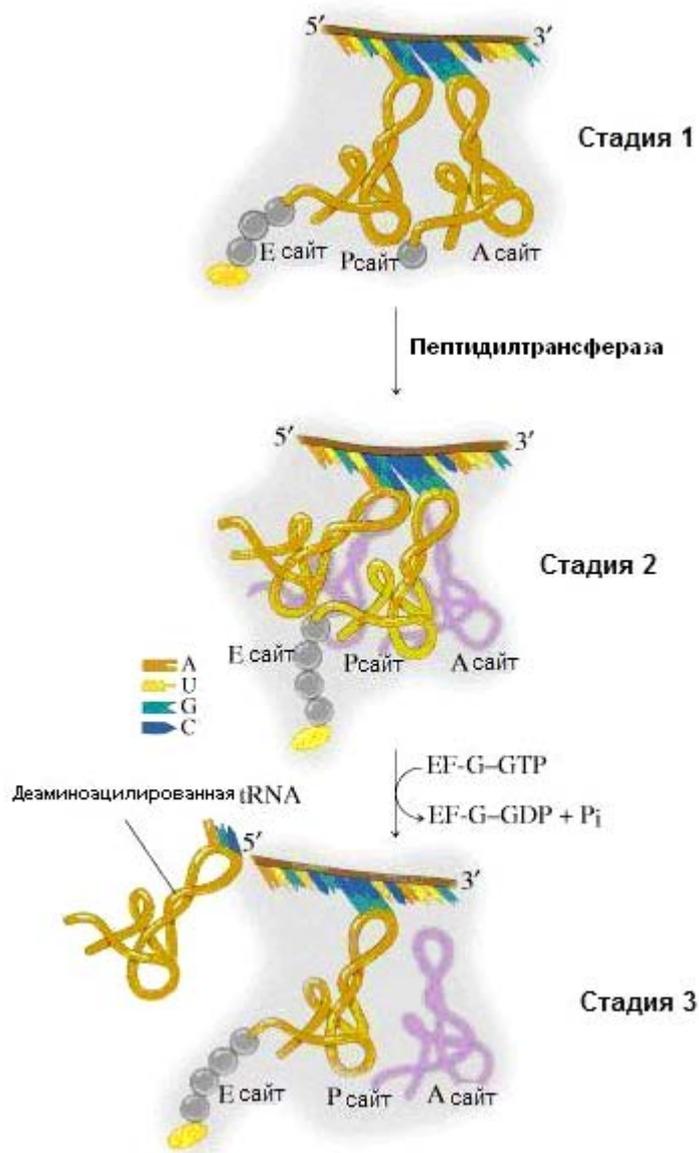


Рис.31.6. Элонгация трансляции у прокариот

Чтобы рибосома могла присоединить очередную aa-тРНК и образовать следующую пептидную связь, в ней должны произойти пространственные перемещения некоторых компонентов. Этот процесс получил название транслокации. Она включает следующие события:

- 1). Перемещение пептидил-тРНК с акцепторного на донорный участок – транслокация тРНК;
- 2). Вытеснение деацилированной тРНК из Р-участка;
- 3). Перемещение рибосомы вдоль мРНК в направлении 5' → 3' на один кодон и установка в акцепторном участке нового кодона – транслокация рибосомы или транслокация мРНК.

Во время транслокации очередная aa-тРНК, вероятно, перемещается из Р-участка в А-участок ([рис. 31.6](#)).

Транслокация в клетке происходит с участием белкового фактора EF-G связанного с GTP (транслоказа). Для удаления EF-G из рибосомы, которое происходит сразу после транслокации, необходим гидролиз GTP. Такое состояние рибосомы называется посттранслоцированным. Рибосома способна повторить весь цикл снова.

Таким образом, на этап элонгации затрачивается две молекулы GTP.

Терминация трансляции

Терминация трансляции – это процесс завершения синтеза п/п цепи и освобождение ее из связи с последней тРНК и рибосомой. Сигналом о завершении трансляции является один из трех бессмысленных кодонов: UAA, UAG, UGA. Помимо терминирующих кодонов в терминации трансляции участвуют три белковых фактора – RF-1, RF-2, RF-3.

Основные стадии терминации:

- 1). Узнавание терминирующего кодона.

Рибосома должна находиться в посттранслоцированном состоянии. ТТ начинается с того, что в А-сайт поступает один из терминирующих кодонов. Поскольку этим кодонам не соответствует какая-либо aa-тРНК, с этим участком связывается один из факторов терминации – RF-1 или RF-2. Эта реакция стимулируется фактором RF-3.

- 2). Гидролиз сложноэфирной связи между С-концом пептидила и ССА-концом донорной тРНК.

Эта реакция осуществляется ПТЦ рибосомы. Факторы терминации делают его способным переносить пептидил на H₂O, вследствие чего пептидил отделяется от рибосомы, но мРНК и деацилированная тРНК продолжают на ней удерживаться. На этом процесс терминации трансляции заканчивается, и все последующие стадии необходимы только для подготовки рибосомы к следующей трансляции.

- 3). Освобождение рибосомы из комплекса с мРНК и тРНК.

Фактор ERF, фактор элонгации EF-G и GTP. Механизм неизвестен.

- 4). Диссоциация рибосомы 70S

Эта стадия протекает с участием IF-3, который специфически взаимодействуя с 30S, способствует ее отделению от 50S.

Эффективность трансляции

Под эффективностью трансляции понимают скорость включения аминокислот в полипептидной цепи. В оптимальных условиях время, необходимое для синтеза п/п цепи, включающей 300-400 а.о., составляет у *E.coli* 10-20 сек, 30-40 (15-20) а.о./сек. У эукариот за секунду включается в п/п цепь 10 а.о.

Следовательно, элонгация п/п цепи небольших размеров продолжается менее 10-30 секунд. Скорость синтеза белка в ретикулоцитах составляет около 1 триплета в секунду и около 7-10 триплетов в секунду у *E.coli*.

Точность белкового синтеза

В среднем на каждые 10^4 аминокислот включается одна неправильная АК и, следовательно, одна ошибка приходится на каждые 25 синтезированных белков, имеющих средний размер (примерно 400 АК).

Точность процесса трансляции зависит от надежности двух механизмов.

1). Связывания каждой аминокислоты с соответствующей молекулой тРНК.

2) Спаривание кодонов мРНК с антикодоном тРНК.

Оба механизма нуждаются в затрате энергии.

У аа-тРНК-синтетазы есть 2 центра, один из них отвечает за присоединение аминокислоты к тРНК, второй – гидролитический, отвечающий за удаление неправильной АК, присоединившейся к тРНК. Этот центр распознает неправильно включенную аминокислоту.

Энергетические затраты на трансляцию

На включение одной аминокислоты в растущую п/п цепь затрачивается 4 макроэнергетические связи: 2 из АТФ в ходе активации аминокислоты (реакция, катализируемая аа-тРНК-синтетазой) и 2 молекулы GTP: одна на связывание аа-тРНК в А-сайте рибосомы, вторая - на транслокацию. Кроме того, необходимо учитывать использование еще двух молекул GTP у прокариот, затрачиваемых на стадию инициации и терминации трансляции. У эукариот на стадию инициации (сканирование мРНК) затрачивается еще и молекула АТФ.

Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Пептидная цепь, растущая в процессе трансляции, принимает вторичную и третичную структуру в результате сложного многоступенчатого процесса, идущего во времени. Для образования правильной структуры с еще не

свернувшейся пептидной цепью связываются специальные белки – шапероны. Шапероны обладают сродством к экспонированным гидрофобным участкам п/п цепи. Связывание с шаперонами препятствует агрегации с другими белками и тем самым создает условия для нормального сворачивания растущего пептида. Взаимодействие с шаперонами – процесс энергозависимый: при освобождении шаперонов гидролизуетея АТР (рис. 31.7).

Шапероны принадлежат к трем белковым семействам, т.н. белкам теплового шока – heat shock proteins (hsp60, hsp70, Hsp90). Свое название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры и других формах стресса. При этом они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. Белки – представители семейства hsp70 – связываются на начальной фазе образования растущего пептида. Одни из них контролируют процесс сворачивания белка hsp60 охватывают синтезированный полипептид наподобие бочонка, тем самым обеспечивая условия для принятия правильной конформации.

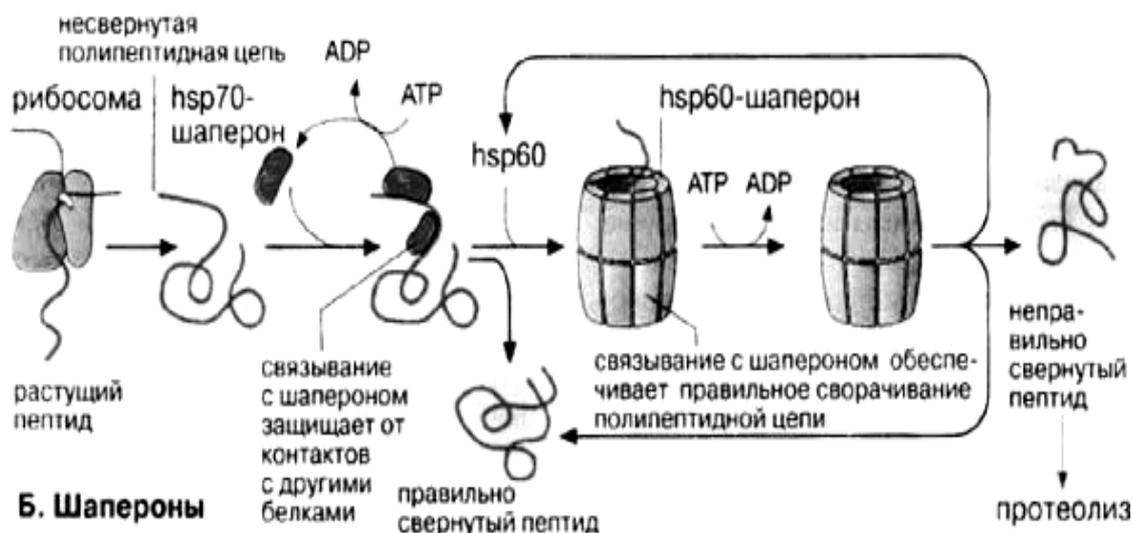


Рис. 31.7. Роль шаперонов в фолдинге полипептидной цепи

Преобразование линейной немодифицированной пептидной цепи в полноценный функциональный белок (созревание) осуществляется в результате многостадийного процесса, который начинается сразу же после начала трансляции и протекает в просвете ЭР (рис. 31.8).

Прежде всего соответствующая *пептидаза* отщепляет сигнальный пептид (1). Фермент узнает точку расщепления в составе специфической N-концевой последовательности белка. Путем окисления боковых цепей цистеина образуются дисульфидные мостики, правильность положения которых контролируется *протеиндисульфид-изомеразой* (2). *Пептидилпролил-изомераза* контролирует *цис-транс-изомеризацию* X-Pro-связей в синтезируемом пептиде (3). *Трансглюкозидазы* переносят олигосахариды в блоке с **долихолом** (длинноцепочечным изопреноидом) на определенные остатки аспарагиновой кислоты в белке, тем самым осуществляя *N-гликозилирование*

белка (4). Гликозидазы «подстригают» олигосахариды, отщепляя избыточные остатки глюкозы и маннозы (5).

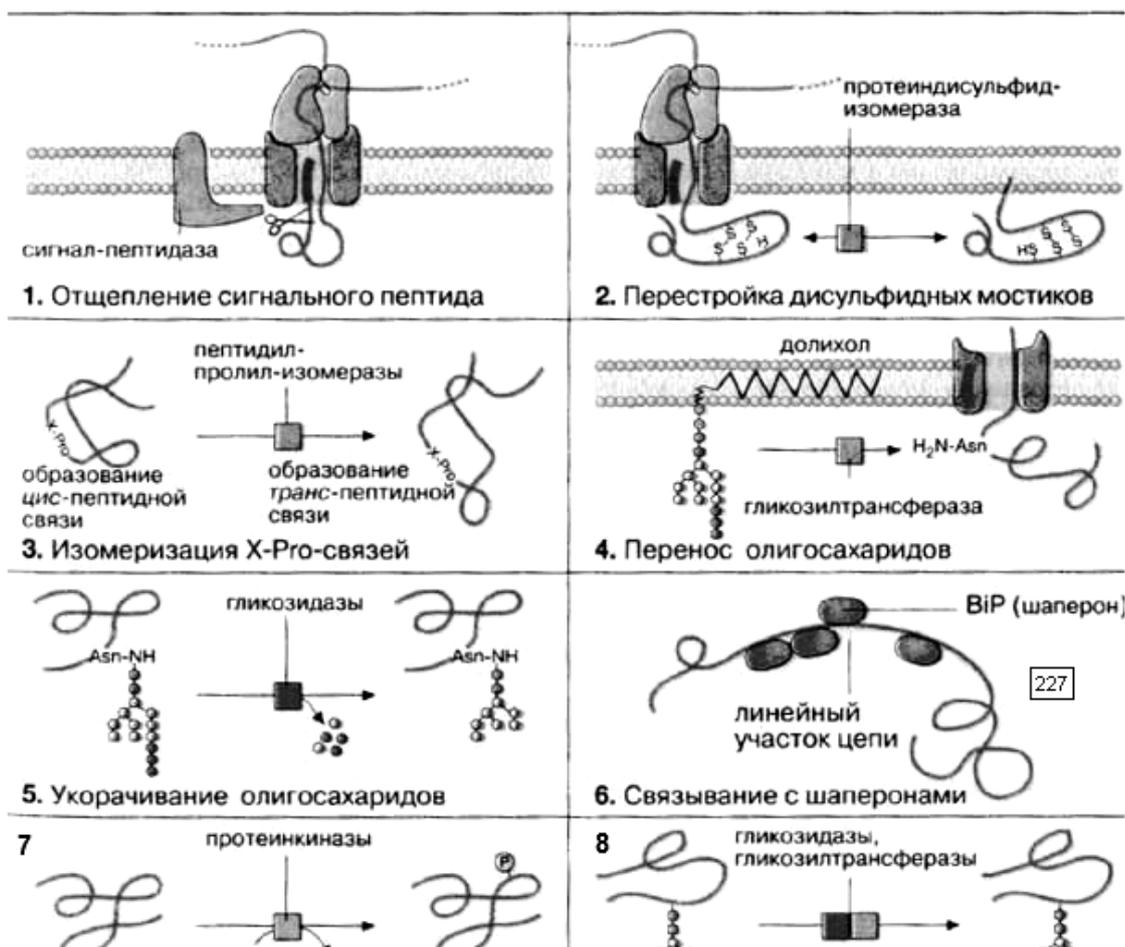


Рис.31.8. Примеры посттрансляционной модификации полипептидной цепи

Для того чтобы растущая полипептидная цепь могла свернуться необходимым образом, с еще линейным участком цепи временно связываются *шапероны* (6). Эти белки направляют процесс свертывания цепи путем подавления нежелательных побочных взаимодействий. Наиболее важным шапероном, присутствующим в просвете ШЭР, является **белок связывания (BiP, от англ. binding protein)**. Когда вновь образованный белок приобретает правильную вторичную и третичную структуру и остатки глюкозы удалены полностью, он с помощью транспортных везикул перемещается в аппарат Гольджи. В аппарате Гольджи осуществляются следующие ферментативные стадии модификации белка: фосфорилирование (7) и отщепление с последующим переносом (перегруппировка) остатков сахаров с помощью *гликозидаз* и *гликозилтрансфераз* (8). Эта модификация имеет целью образование специфической олигосахаридной структуры в гликопротеинах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основная литература

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. И др. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. – М.: Мир, 1994. Т.1. - с. Т.2. - с. Т.3. - с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.: ил. – (Учеб. лит. для студентов мед. вузов).
3. Биохимия: Учебник /Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.: ил. □ (Серия «XXI век»).
4. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами /Под ред Е.С. Северина, А.Я Николаева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 448 с.: ил. □ (Серия «XXI век»).
5. Граник В.Г. Метаболизм эндогенных соединений: Монография. – М.: Вузовская книга, 2006. – 528 с.: ил.
6. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1998. – 479 с.: ил.
7. Кольман Я., Рэм К-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
8. Конищев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология: Учеб. для студ. пед. вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 400 с.
9. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: Учеб. для биол. спец. вузов/В.А. Агол, А.А. Богданов, В.А. Гвоздев и др.; Под ред А.С. Спирина. – М.: Высш.шк., 1990. – 352 с.
10. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. – 544 с.: ил.
11. Мюльберг А.А. Фолдинг белка: Учеб. Пособие. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. – 156 с.
12. Николаев А.Я. Биологическая химия: Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 568 с.: ил.
13. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
14. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка – М.: Высшая школа, 1986. – 303 с.
15. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: Учеб. для биол. спец. вузов /Под ред А.С. Спирина. □ М.: Высш.шк., 1996. – 335 с.: ил.
16. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Пер. с англ. – М.: БИНОМ-Пресс, 2003. – 272 с.: ил.
17. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии: Учеб. Для хим. И биол. Спец. пед. Ун-тов и ин-тов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.:Изд-во «Агар», 1999. – 512 с.: ил.

18. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.
19. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. – М.: НИИ Биомед. химии РАМН, 1999.

Дополнительная литература

1. Белки и пептиды: В 2-х т.- М.: Наука, 1995. – Т.1. – 448 с.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
3. Мецлер Д. Биохимия. В 3-х т. - М.: Мир, 1980.
4. Овчинников Ю.В. Биоорганическая химия. – М.: Наука, 1987. – 815 с.
5. Проблема белка. Т.1: Химическое строение белка /Е.М. Попов, П.Д. Решетов, В.М. Липкин и др. – М.: Наука, 1995. – 496 с.
6. Проблема белка. Т.2: Пространственное строение белка /Е.М. Попов, В.В. Демин, Е.Д. Шибанова. – М.: Наука, 1996. – 480 с.
7. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1998.
8. Кларк Д., Рассел Л. Молекулярная биология. – М.: ЗАО «Компания КОНД», 2004. – 472 с.
9. Успехи биологической химии. (периодическое издание, 1998-2005). - Пущино, ОНТИ ПНЦ РАН.
10. Elliott W., Elliott D.C. Biochemistry and Molecular Biology. Second edition - Oxford : University Press, 2001. – 586 p.
11. Leninger A., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of Biochemistry (Fourth Edition). Электронный ресурс (www.Molbiol.ru).