УДК 557.1
ББК 28.072
К 53

Рецензент: д-р биол. наук Б.Ф. Поглазов
(ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН)

Кнорре Д.Г., Мызина С.Д.

К 53 Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. — 3-е изд., испр. — М.: Высш. шк., 2000. — 479 с.: ил.

ISBN 5-06-003720-7

В третьем издании учебника (2-е — 1998) сохранены основные акценты, направленные на изложение структуры и свойств важнейших биополимеров, роли их пространственной организации в обеспечении специфичности биохимических процессов, роли ферментов в химических превращениях в живой природе, роли матричного биосинтеза как пути обеспечения многообразия структур с помощью универсальных катализаторов. Дополнительно включены вопросы, получившие развитие в последние годы, такие как рибозимы — ферменты на основе РНК, методы молекулярной селекции нуклеиновых кислот, динамические аспекты биологического катализа и компьютерные подходы к изучению структуры и функции биополимеров. При рассмотрении экспериментальных методов биохимии усилено внимание к методам, порожденным самой биохимией, в особенности использованию матричных ферментов в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Для студентов химических, биологических и медицинских специальностей вузов.

УДК 557.1
ББК 28.072

ISBN 5-06-003720-7

© ГУП издательство "Высшая школа", 2000

Оригинал-макет данного издания является собственностью издательства "Высшая школа" и его репродуцирование (воспроизведение) любым способом без согласия издательства запрещено.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 6
Введение 8

Глава 1. Уровни организации живой материи 13

1.1. Молекулярный уровень организаций живой материи 13
1.2. Клетка - основной структурный элемент живой материи. Клеточный уровень организации жизни 20
1.3. Основные черты организации эукариотических клеток 24
1.4. Многоклеточные организмы 26

Глава 2. Главные химические компоненты живых организмов 30

2.1. Белки и их главные биологические функции 30
2.2. Углеводы. Моносахариды и полисахариды. Запасные полисахариды. Клеточная стенка 42
2.3. Нуклеиновые кислоты - носители наследственной информации 49
2.4. Клеточные мембраны. Липиды 55
2.5. Основные группы низкомолекулярных органических соединений в живой природе 58
2.6. Элементный состав живой материи 64

Глава 3. Пространственная структура биополимеров и ее роль в обеспечении специфичности биохимических процессов. Нековалентные взаимодействия в биологических системах 68

3.1. Основные типы нековалентных взаимодействий в живой природе 68
3.2. Молекулярное узнавание в биохимических системах 76
3.3. Пространственная структура белков 79
3.4. Пространственная структура нуклеиновых кислот 91
3.5. Самоорганизация пространственной структуры биополимеров 100
3.6. Комплексы биополимеров. Многосубъединичные белки 102
3.7. Двуспиральные нуклеиновые кислоты 104
3.8. Нуклеопротеиды 110
3.9. Направленные конформационные переходы в биополимерах 114
3.10. Количественные закономерности специфических взаимодействий биополимер –лиганд 117
Задачи 125

Глава 4. Ферменты 128

4.1. Оксидоредуктазы 129
4.2. Трансферазы 135

4.3. Гидролазы . . . 141
4.4. Лиазы . . . 145
4.5. Изомеразы . . . 147
4.6. Лигазы (синтетазы) . . . 149
4.7. Кофакторы, коферменты и витамины . . . 153
4.8. Применение ферментов в медицине и биотехнологии . . . 158
Задачи . . . 161

Глава 5. Матричный биосинтез биополимеров . . . 162

5.1. ДНК - основной носитель наследственной информации . . . 162
5.2. Генетический код . . . 172
5.3. Общие принципы матричного биосинтеза . . . 174
5.4. Биосинтез ДНК (репликация) . . . 177
5.5. Биосинтез РНК (транскрипция) . . . 183
5.6. Биосинтез белков (трансляция) . . . 188
5.7. Особые случаи репликации и транскрипции у вирусов . . . 193
Задачи . . . 197

Глава 6. Ферменты. Механизмы действия . . . 199

6.1. Активные центры ферментов . . . 200
6.2. Основные принципы кинетики ферментативных реакций . . . 208
6.3. Ингибирование и активация ферментов . . . 215
6.4. Рибозимы . . . 219
6.5. Динамические аспекты молекулярной энзимологии . . . 222
Задачи . . . 228

Глава 7. Методы исследования биополимеров . . . 230

7.1. Традиционные методы выделения и очистки биополимеров, используемые в физической и аналитической химии . . . 233
7.2. Аффинные методы выделения и очистки биополимеров . . . 246
7.3. Методы детекции биополимеров . . . 248
7.4. Иммуноанализ . . . 256
7.5. Молекулярная гибридизация и амплификация нуклеиновых кислот . . . 260
7.6. Определение молекулярной массы биополимера . . . 265
7.7. Определение первичной структуры белков . . . 269
7.8. Определение первичной структуры нуклеиновых кислот . . . 275
7.9. Химический синтез полипептидов и белков . . . 283
7.10. Химический синтез олиго- и полинуклеотидов . . . 293
7.11. Генетическая инженерия . . . 299
7.12. Молекулярная селекция нуклеиновых кислот . . . 306
7.13. Рентгеноструктурный анализ биополимеров . . . 309
7.14. Двумерная ЯМР-спектроскопия биополимеров . . . 313
7.15. Пространственная структура биополимеров по данным молекулярной механики и молекулярной динамики . . . 318
7.16. Химические методы изучения пространственной структуры биополимеров . . . 323
7.17. Аффинная модификация биополимеров . . . 329
Задачи . . . 335

Глава 8. Основы биоэнергетики . . . 339

8.1. Общие принципы биоэнергетики . . . 341
8.2. Гликолиз . . . 345
8.3. Окисление жирных кислот . . . 351
8.4. Цикл трикарбоновых кислот . . . 354
8.5. Цепь переноса электронов и окислительное фосфорилирование . . . 357
8.6. Биоэнергетическая эффективность окисления углеводов и жирных кислот . . . 361
8.7. Световые стадии фотосинтеза. Фотосинтетическое фосфорилирование . . . 362
Задачи . . . 366

Глава 9. Биохимические цепи и циклы . . . 367

9.1. Биосинтез моно- и полисахаридов . . . 367
9.2. Биосинтез жирных кислот и фосфолипидов . . . 376
9.3. Биосинтез липидов, построенных из изопентильных фрагментов. Биосинтез стероидов . . . 381
9.4. Метаболизм азота . . . 385
9.5. Биосинтез и биохимические превращения аминокислот . . . 390
9.6. Биосинтез нуклеотидов . . . 409
9.7. Биохимические цепи и циклы как общий принцип организации систем биохимических превращений в живой природе . . . 412
Задачи . . . 418

Глава 10. Регуляция систем биохимических процессов и пространственная организация биохимических процессов в клетке . . . 419

10.1. Стехиометрическая и аллостерическая регуляция систем биохимических процессов . . . 421
10.2. Химическая модификация как путь регуляции функциональной активности белков . . . 424
10.3. Регуляция транскрипции . . . 428
10.4. Компартментализация биохимических процессов . . . 431
10.5. Биохимические аспекты мышечного сокращения . . . 435

Ответы к задачам . . . 438
Приложение . . . 448
Рекомендуемая литература . . . 466
Предметный указатель . . . 468

ПРЕДИСЛОВИЕ

Второе издание учебника по биологической химии, как и первое, написано по материалам лекций, которые авторы на протяжении ряда лет читают на биологическом и химическом отделениях факультета естественных наук Новосибирского государственного университета. Хотя с момента выхода первого издания прошло не очень много времени, учебник потребовал некоторой доработки в связи с бурным развитием ряда областей биохимии и смежных дисциплин. Достаточно упомянуть такие понятия, как рибозимы — ферменты, построенные из молекул РНК и не содержащие белка, как селекция нуклеиновых кислот *in vitro*, превратившаяся в могучий инструмент исследования взаимодействий нуклеиновых кислот между собой и с другими лигандами, как интенсивное развитие антисмысловой технологии в качестве наиболее направленного подхода к борьбе с вирусными и онкологическими заболеваниями, понятие об апаптозе — запрограммированной клеточной смерти, по-видимому, являющейся важным путем регуляции клеточных делений и, в частности, предотвращения малигнизации клеток. Без представления этих понятий и ознакомления с новыми революционизирующими исследования методами невозможно полноценное биохимическое образование.

Кроме того, накопленный авторами опыт преподавания биохимии привел авторов к мысли о необходимости определенной перекомпоновки материала. Например, в связи с резко возрастающим значением экспериментальных методов, основанных на использовании ферментов биосинтеза нукленновых кислот, авторы пришли к выводу, что целесообразно все методы исследования объединить в главе "Методы исследования биополимеров" после изложения всех вопросов ферментативного катализа.

Авторы также пришли к выводу, что нецелесообразно выделить в виде отдельной главы вопросы, связанные с пространственной организацией биохимических процессов, сохранив в виде параграфа лишь вопрос о роли пространственного разобщения биохимических процессов как одного из регуляторных механизмов. Из огромной проблемы пространственной организации биохимических процессов в качестве иллюстрации сложности надмолекулярных структур, необходимых для реализации биологических процессов на уровне организма, сохранен параграф, посвященный биохимическим аспектам мышечного сокращения, тем более что это дает возможность осветить один из важнейших механизмов преобразования энергии (в данном случае химической энергии в механическую) и одновременно ознакомить читателя с такой биохимической классикой, как функции актина, миозина и актомиозинового комплекса. На этом примере отчетливо видно, что назрел вопрос о создании второй части этого учебника, посвященной физиологическим приложениям биохимии. Это в будущем можно было бы сделать, опираясь на курс лекций по физиологической химии, который был создан и на протяжении ряда лет читался в НГУ академиком Р.И.Салгаником, а в настоящее время читается и перерабатывается одним из авторов этого учебника. В то же время авторы сочли целесообразным усилить изложение ряда биологических понятий, выделив этот материал в отдельную главу «Уровни организации живой материи».

В результате учебник построен, как и первое издание, из десяти глав. После гл. 1, представляющей собой биологическое введение к курсу, в гл. 2 излагаются данные об основных химических компонентах живой материи. Эта глава, как гл. 3, посвященная пространственной структуре биополимеров и роли ее в биологических функциях белков и нуклеиновых кислот, подверглись лишь незначительному редактированию. Изложение вопроса о ферментах в гл. 4—6 несколько перекомпоновано. В основном изменение состоит в том, что вопрос о механизме действия ферментов перенесен в конец изложения учения о ферментах, поскольку он в равной мере относится и к матричному биосинтезу и поэтому не должен ему предшествовать. Кроме того, в гл. 6, посвященной вопросу о механизме действия ферментов, введены параграфы о рибозимах и о динамических аспектах ферментативного катализа, поскольку именно эти аспекты становятся горячей точкой современного учения о ферментативном катализе.

Гл. 7, посвященная методам исследования биополимеров, существенно расширена за счет изложения экспериментальных подходов и попыткой ознакомить читателя с некоторыми теоретическими методами анализа структуры и динамики биополимеров.

Гл. 8 и 9, посвященные изложению основ биоэнергетики и систем биохимических процессов, в своих основных чертах оставлены без изменений. Хотя эти области биохимии продолжают интенсивно развиваться, фундамент этих областей знания можно считать прочно установившимся, и материал, представляющий основную учебную значимость, едва ли требует серьезной корректировки.

В гл. 10 рассмотрены вопросы регуляции систем биохимических процессов, включая, как уже было сказано, и регуляторные аспекты пространственного разобщения этих процессов.

Авторы

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия — это наука о веществах, из которых построены живые организмы, и о химических процессах, протекающих в живых организмах. Она является основой для глубокого понимания всего, что происходит на более высоких уровнях организации живой материи и в первую очередь в клетках и живых организмах. Без этого понимания сегодня уже невозможно изучение на современном уровне таких фундаментальных биологических дисциплин, как клеточная биология, физиология, генетика. Непрерывно возрастает воздействие биохимии на важнейшие связанные с живой природой сферы человеческой деятельности — здравоохранение, сельское хозяйство, биотехнологическую промышленность, охрану окружающей среды. Поэтому без опоры на биохимические знания сегодня немыслимо полноценное биологическое, медицинское, агрономическое, экологическое образование.

Вместе с тем, по мнению авторов, становится все более очевидной необходимость введения курса биохимии в систему химического образования. Это важно как с чисто прагматической точки зрения, так и для формирования более цельного мировоззрения специалистов-химиков. Направленный синтез биологических веществ — лекарственных препаратов, гербицидов для борьбы с сорняками в сельском хозяйстве, инсектицидов для истребления вредных насекомых, развитие методов анализа, имеющих диагностическую значимость, изучение природы воздействия токсических веществ на человека и другие живые организмы — все это и многое другое требует понимания механизма взаимодействия химических веществ с биологическими системами. Без этого химические исследования имеют в основном эмпирический характер. В то же время биохимические процессы все в большей мере начинают использоваться для осуществления химических превращений вне живых организмов, и знание возможностей биохимии существенно обогащает арсенал подходов, с помощью которых химик может решать стоящие перед ним проблемы. Особенно существенно для химика знание основ биологического катализа как наиболее совершенного класса каталитических процессов, принципы которого могут открыть новую страницу в развитии науки о катализе в целом. Широко обсуждается и в ряде случаев уже реализуется использование сложных биохимических структур в качестве биосенсоров для аналитических целей и в перспективе для развития принципиально новой базы для электроники.

Мировоззренческое значение биохимии для химического образования в первую очередь определяется тем, что системы, с которыми имеют дело биохимики, это одна из специфических форм протекания химических процессов. Главной отличительной чертой этих систем является высокий уровень их организации. Поэтому знание биохимии дает представление о том, как химические законы проявляются в высокоорганизованных системах.

В живой природе встречаются многие тысячи различных химических соединений и протекают тысячи разнообразных химических превращений. Многие из них уже достаточно хорошо известны. Часть этих веществ и превращений свойственна всем представителям живой природы, другие встречаются лишь у определенных систематических групп живых организмов. У многоклеточных организмов, в том числе и у человека, многие вещества и превращения характерны для определенных органов или систем — пищеварительной, кровеносной, эндокринной, иммунной и т.д. Полное представление материала, накопленного биохимиками, невозможно не только в рамках учебника, но и в объемистых монографиях. Авторы поставили перед собой задачу, не давая читателю утонуть в чрезмерном количестве деталей, изложить, опираясь на наиболее достоверно установленные и наиболее глубоко осмысленные факты, основные принципы биохимии. При этом главный упор делается на аспекты, которые в познавательном и методическом плане особенно четко отличают биохимические системы от тех, с которыми имеют дело классические неорганическая и органическая химия и традиционная химия высокомолекулярных соединений.

Высокий уровень структурной и функциональной организации живой материи в первую очередь обеспечивается участием особых биополимеров — белков и нуклеиновых кислот. Для каждого индивидуального биополимера характерен определенный порядок чередования разнотипных мономерных звеньев, образованных в случае белков двадцатью различными аминокислотами, а в случае нуклеиновых кислот — четырьмя различными нуклеотидами. Это создает основу неисчерпаемого многообразия таких биополимеров. Кроме того, полимерные цепи обеих групп биополимеров содержат большое число простых связей, и поэтому каждый индивидуальный биополимер может существовать в виде неисчислимого множества конформеров. Однако в результате многочисленных нековалентных взаимодействий, в которых участвуют как фрагменты остова полимера, так и различные боковые радикалы, в условиях существования живых организмов предпочтительным оказывается ограниченное число конформаций. Поэтому каждый биополимер обладает не только уникальной последовательностью чередования мономерных звеньев, но и уникальной пространственной структурой или небольшим набором таких структур.

Фундаментальную роль в пространственной организации отдельных клеток и живых организмов и в протекании биохимических процессов играет способность молекул белков и нуклеиновых кислот к опознаванию строго определенных партнеров, которая выражается в резко преимущественном образовании комплексов именно с этими партнерами. Возможность высокоспецифичного образования комплексов обеспечивается наличием у биополимера набора функциональных групп, предназначенных для взаимодействия с адекватным набором групп в узнаваемой молекуле. Пространственная структура биополимера обеспечивает взаимное расположение этих функциональных групп, оптимальное для такого взаимодействия.

Как формирование биополимерами уникальной пространственной структуры, так и способность их к высокоспецифичному образованию комплексов с определенными биополимерами или молекулами низкомолекулярных соединений (лигандами) обусловлены нековалентными взаимодействиями — ван-дер-ваальсовыми, электростатическими, образованием водородных связей. Важная, во многом определяющая роль относительно слабых нековалентных взаимодействий в сис-

темах, изучаемых биохимией, намного превосходящая их роль в формировании низкомолекулярных соединений и в протекании их превращений в растворах и в твердых телах, — отличительная черта организации и функционирования живой материи.

Большое число биологических событий начинается со взаимодействия определенного белка со специфичным к нему лигандом, которое служит сигналом для некоторого последующего действия. Само действие связано с изменением в воспринимающем сигнал биополимере, которое чаще всего представляет собой изменение пространственной структуры белка, т.е. его конформации. Поэтому важную роль в функционировании живых систем играет способность биополимеров к направленному изменению конформации (направленным конформационным переходам).

Биохимия является в основном экспериментальной наукой. Она опирается на арсенал методов, созданных неорганической, органической, аналитической и физической химией. Однако многие из задач, с которыми сталкиваются биохимики, вследствие специфики изучаемых объектов требуют нетрадиционных подходов. В первую очередь это касается изучения биополимеров. Например, химический синтез белков представляет собой повторение десятки или даже сотни раз реакции образования пептидной связи с целью последовательного присоединения на каждой стадии к растущей полимерной цепи определенного аминокислотного остатка. Образование пептидных связей прекрасно отработано и с точки зрения классической органической химии не представляет ни трудности, ни интереса. Но необходимость проводить последовательно множество таких превращений без существенного уменьшения выхода, без повреждения уже созданной на предыдущих этапах синтеза полипептидной цепи ставит свои специфические проблемы, которые решаются оригинальными, разработанными именно для таких задач приемами. Венцом этих приемов является автоматический твердофазный синтез полипептидов. Столь же не традиционно выглядит задача установления химического строения биополимеров. Структуры отдельных мономерных звеньев как белков, так и нуклеиновых кислот давно установлены с использованием классических методов органической химии, и задача сводится к тому, чтобы для каждого конкретного биополимера определить, в каком порядке в изучаемой полимерной цепи располагаются разнотипные мономерные звенья.

Биохимия не только использует в своих целях методы, созданные в рамках других химических дисциплин, но и вооружает химию новыми методами, основанными на применении биополимеров как инструмента химического исследования. Ферменты часто позволяют с уникальной, недоступной обычным химическим приемам избирательностью провести анализ сложных реакционных смесей, осуществить химические превращения в мягких условиях, избегая побочных реакций и побочных продуктов. Большое значение для решения тонких аналитических задач приобрели иммунохимические методы, использующие в качестве инструмента анализа антитела — белки, вырабатываемые высшими живыми организмами в ответ на введение чужеродных веществ. Антитела обладают способностью избирательно взаимодействовать именно с этими, вызвавшими иммунный ответ веществами и могут поэтому использоваться для их определения в сложных смесях.

Главной чертой химических превращений в живых организмах является участие в них специальных биологических катализаторов — ферментов. Для ферментов характерна исключительно высокая избирательность по отношению к веществам, превращения которых они катализируют, — субстратам. Второй их отличительной чертой является способность эффективно катализировать химические превращения в мягких условиях — водных растворах, чаще всего с pH, близким к нейтральному, и при 20—40°C и даже ниже.

До недавнего времени считалось, что обязательным компонентом всех ферментов являются белки. Был накоплен огромный материал, свидетельствующий, что именно белки способны опознавать определенные субстраты, обеспечивая тем самым высокую специфичность биологического катализа. Кроме того, многочисленные данные демонстрировали, что белки обеспечивают оптимальную ориентацию субстратов относительно функциональных групп фермента, осуществляющих химическое превращение. Этими группами в случае кислотного, основного и нуклеофильного катализа чаще всего являются группы, входящие в состав белка. В случае электрофильного и окислительно-восстановительного катализа в химическом превращении, как правило, участвуют специальные кофакторы — ионы металла или сложные органические молекулы. Но в этом случае белковая часть фермента организует работу кофактора так, чтобы обеспечивалась свойственная ферменту специфичность и одновременно с высокой эффективностью реализовался каталитический потенциал кофактора. Однако в начале 80-х годов были открыты и стали объектом интенсивных исследований ферменты, построенные из молекул рибонуклеиновых кислот (рибозимы). Интерес к этой группе ферментов резко усилился в связи с разработкой методов молекулярной селекции нуклеиновых кислот, позволившей, в частности, начать направленное конструирование рибозимов с разнообразными типами каталитической активности.

Химические превращения, изучаемые биохимией, — это в подавляющем большинстве случаев процессы, катализируемые ферментами. Применительно к реакциям, протекающим с участием ферментов, и системам таких реакций, приводящим в итоге к определенному химическому результату, часто применяют термин *биохимическое превращение.*

Химические реакции, протекающие в живой природе, и субстраты этих реакций чрезвычайно разнообразны. Вместе с тем имеется отчетливая тенденция использовать для однотипных реакций одни и те же сложные органические молекулы. Например, во многих десятках различных реакций окисления спиртов и карбонильных соединений в качестве окислителя используется одно и то же соединение — никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Такие используемые в большой группе биохимических превращений вещества называют *коферментами.* Чаще всего они выполняют роль универсальных переносчиков отдельных атомов или групп. НАД, например, является универсальным переносчиком атомов водорода, кофермент А — универсальный переносчик ацильных групп, тетрагидрофолат — одноуглеродных фрагментов и т.д.

Наиболее высокоорганизованными являются ферменты, с помощью которых осуществляется синтез новых молекул биополимеров, белков и нуклеиновых кислот. Эти ферменты обладают способностью не только катализировать образование пептидных или межнуклеотидных связей, но и воспринимать информацию, поступающую в виде специальных информационных молекул — нуклеиновых кислот. На каждом этапе роста цепи нуклеиновые кислоты программируют, какой из мономеров должен быть отобран ферментом и присоединен к растущей синтезируемой цепи. Такие информационные молекулы называют матрицами, а фер-

менты, катализирующие синтез биополимеров по программам, задаваемым матрицами, — ферментами матричного биосинтеза.

Конечной целью химических процессов, протекающих в живой природе, чаще всего является либо синтез сложных органических молекул из простых, доступных живому организму предшественников, либо деградация таких молекул до простых соединений, выводимых из организма. Важную роль химические превращения играют в обеспечении жизнедеятельности организма энергией, необходимой для совершения различных видов работы. В этом случае с целью уменьшения бесполезного рассеяния энергии в теплоту желательно разумное приближение к обратимому протеканию превращения. Каждая такая задача решается системой последовательных реакций, оптимизированной по химическому содержанию и энергетике каждого этапа и осуществляемой каскадом ферментов. Как правило, такие системы подвержены различным регуляторным воздействиям, т.е. в зависимости от конкретной биологической ситуации они могут включаться и выключаться или, по крайней мере, скорость и масштаб их функционирования могут изменяться в весьма широких пределах. Организация химических превращений веществ в виде регулируемых систем каталитических реакций — важнейшая особенность химии живых организмов.

Эффективное функционирование таких систем в ряде случаев достигается специальной пространственной организацией составляющих элементов. Так, группа ферментов, катализирующих цепочку последовательных превращений, может быть организована в единый комплекс, что облегчает поступление продукта одной реакции к ферменту, использующему этот продукт в качестве субстрата для дальнейшего превращения. Особенно существенна специальная пространственная организация биохимических систем, участвующих в восприятии и преобразовании сигналов и в процессах, связанных со взаимопревращениями различных форм энергии.

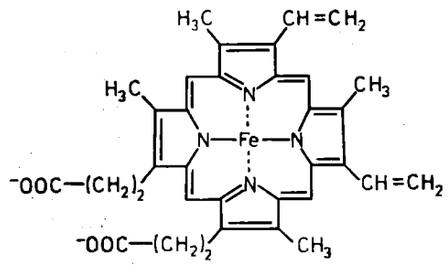
Именно эти главные особенности биохимических объектов и биохимических превращений положены в основу построения предлагаемого читателю курса биохимии.

ГЛАВА 1

УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВОЙ МАТЕРИИ

1.1. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВОЙ МАТЕРИИ

Живые организмы состоят из огромного числа различных химических компонентов — органических и неорганических, низкомолекулярных и полимерных. Прежде всего среди неорганических компонентов должна быть названа вода, так как все известные жизненные процессы протекают в водных растворах. Для поддержания ионной силы и pH среды, при которых протекают процессы жизнедеятельности, необходимы определенные концентрации неорганических ионов. Многочисленные органические соединения, например, этиловый спирт, ацетальдегид, уксусная кислота, являются продуктами и субстратами биохимических превращений. Большое число соединений, найденных в живых организмах, представляют собой различные комплексы. В качестве примера можно привести *гем*, который представляет собой комплекс железа с плоской молекулой протопорфирина:



1

В живой материи широко представлены различные регулярные полимеры. Например, чрезвычайно широко распространенная в растительном мире целлюлоза является полисахаридом, состоящим из повторяющихся молекул β-D-глюкозы. Однако такие молекулы не могут образовать даже самые простейшие формы жизни. Последние характеризуются значительно высоким уровнем организации и, следовательно, требуют значительно более сложных и специализированных соединений. Таковыми являются белки и нуклеиновые кислоты — сложные полимерные молекулы, обязательные компоненты живых организмов. Структура и функции этих соединений будут детально описаны в последующих главах этой книги. Задача данной главы — показать основные принципы организации биополимеров, продемонстрировать, как эти принципы позволяют выполнять основополагающие функции живых организмов: передавать из поколения в поколение

наследственную информацию, осуществлять метаболизм (совокупность химических реакций, протекающх в организме) и обеспечивать эволюцию живых существ.

Среди большого числа различных функций, выполняемых белками, в первую очередь следует отметить их роль в протекании метаболических процессов. Многочисленные химические превращения в клетке осуществляются в мягких условиях при температурах, близких к 40°С, и значениях pH среды, близких к нейтральным. В этих условиях скорости протекания большинства химических превращений в живых организмах ничтожно малы, поэтому обязательно присутствие специальных биологических катализаторов — *ферментов* (*энзимов*). Даже такая простая реакция, как дегидратация угольной кислоты

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

до диоксида углерода, катализируется в живых организмах специальным ферментом — *карбоангидразой*. Как правило, ферменты — это либо белки, либо комплексы белков с каким-либо *кофактором* — ионом металла или специальной органической молекулой.

Белки представляют собой полимеры, построенные из α-аминокислот, соединенных так называемой пептидной связью. Таким образом, с химической точки зрения, они являются полипептидами. На сегодняшний день может считаться установленным, что все белки строятся из набора 20 различных аминокислот. Следовательно, белки могут различаться длиной полипептидной цепи, числом каждой из 20 аминокислот, присутствующих в полимерной молекуле, и порядком чередования аминокислотных остатков вдоль цепи. Из двадцати различных аминокислот, содержащих N аминокислотных остатков, можно построить 20^N различных полипептидов. Поэтому даже для сравнительно короткого полипептида, содержащего всего 100 аминокислотных остатков, это число будет равно $20^{100} = 10^{130}$. Эта величина превышает суммарное число нуклонов во всей доступной наблюдению части Вселенной на 50 порядков. Поэтому число мыслимых аминокислотных последовательностей может рассматриваться как практически неисчерпаемое. Кроме участия в биокатализе белки выполняют и многие другие разнообразные и важные функции, которые будут рассмотрены как в этой, так и в последующих главах книги. Однако уже только тот факт, что белки выполняют функции ферментов, свидетельствует об их абсолютной необходимости для живых организмов. Конечно, ни каталитическая, ни какая другая функция белков отнюдь не присущи полипептидам как классу полимерных молекул. Она присуща белку со строго определенной последовательностью аминокислот и только в определенных условиях. Скорее всего среди бесчисленного множества мыслимых аминокислотных последовательностей лишь небольшая часть соответствует каким-либо функционально значимым белкам.

Структура полимерных молекул, построенных из повторяющихся единиц и содержащих σ-связи в пределах основной цепи, является гибкой в силу возможности внутреннего вращения вокруг большинства таких связей. При этом каждый поворот может радикально изменить взаимное расположение двух фрагментов полимерной молекулы, образующих эту σ-связь. Это происходит без каких-либо химических изменений, и эти состояния рассматриваются как различные конформации, а сами структуры — как различные *конформеры*. При достаточно высоких температурах может реализовываться огромное число различных конформеров, находящихся в состоянии непрерывного взаимопревращения. В химии высокомолекулярных соединений такое состояние полимерной молекулы называют *статистическим клубком*.

Однако при определенных условиях полипептиды могут образовывать определенные пространственные (трехмерные) структуры. Эти структуры образуются вследствие внутримолекулярного взаимодействия друг с другом и с растворителем различных групп мономерных звеньев полимерной молекулы. Например, в 1951 г. Лайнус Полинг и Роберт Кори теоретически предсказали, что полипептиды могут образовывать спиральную структуру вследствие наличия водородных связей между карбонильным атомом кислорода i-го фрагмента и амидным атомом водорода $(i + 4)$-го фрагмента, что в дальнейшем нашло подтверждение на большом экспериментальном материале. Каждый белок с определенной нерегулярной последовательностью аминокислот может образовать уникальную пространственную структуру. Следует отметить, что любая тонкая биологическая функция, выполняемая белком, реализуется только при наличии такой структуры. Любое ее нарушение нагреванием или изменением pH среды (*денатурация*), не сопровождающееся расщеплением ковалентных связей, приводит к полной потере функциональной активности белка. Лишь небольшие белки могут легко претерпеть обратное превращение в исходное состояние. Обратное превращение денатурированного высокомолекулярного белка в исходную биологически активную структуру (*ренатурация*) возможно, только если использовать специальную процедуру, т.е. в том случае, если ни мономерные компоненты, ни полимерные цепи не были повреждены в процессе денатурации.

Важность пространственной структуры биополимеров может быть легко понята, если принять во внимание их важнейшую для функционирования особенность — способность избирательно образовывать комплексы с определенными партнерами (лигандами), или, как принято говорить в биохимии, "узнавать" определенных партнеров. Способность к *узнаванию* существенна прежде всего в двух аспектах. Первым шагом в проявлении белком его функциональной активности чаще всего является узнавание партнера. Например, фермент образует специфический комплекс с *субстратами* — веществами, химическое превращение которых он катализирует. Для узнавания необходима правильная взаимная ориентация реагирующих субстратов и определенных групп белковой молекулы фермента и кофактора, если этот фермент содержит кофактор, необходимый для проявления ферментативной активности. Комплекс образуется в результате многоточечного взаимодействия между определенными атомами молекулы субстрата и соответствующими группами белковой молекулы. Однако для такого взаимодействия эти группы белка должны быть правильным образом взаимно ориентированы в белковой молекуле. Это возможно только при определенной пространственной структуре белка. Денатурация нарушает правильную ориентацию групп друг относительно друга и, следовательно, уничтожает способность к узнаванию лиганда.

Часто белки функционируют в виде сложных высокоорганизованных комплексов, содержащих несколько полипептидных цепочек, а в некоторых случаях и других полимерных молекул или низкомолекулярных компонентов. Для формирования таких комплексов составляющие их белки должны иметь на поверхности специально организованные области, обеспечивающие определенные контакты с другими компонентами комплекса. У денатурированных белков отсутству-

ет упорядоченная поверхность и, соответственно, отсутствует возможность образования контакта с остальными компонентами комплекса.

Вследствие необходимости создания пространственной структуры белка для образования области узнавания со строго определенным взаимным положением некоторых групп изменение аминокислотной последовательности или химической природы мономерных компонентов может приводить (не неизбежно) к драматическим последствиям для проявления белком биологической активности. Изменение положения одной из аминокислот белка, непосредственно участвующей в узнавании, приводит к потере способности формировать функционально активную пространственную структуру.

Способность узнавать определенных партнеров приводит в результате к образованию специфического комплекса. Однако в наибольшем числе случаев за узнаванием следует определенный ответ системы, т.е. определенное действие. В отсутствие каких-либо химических изменений таким ответом может быть только изменение его пространственной структуры, т.е. конформации. Это означает, что первичное узнавание лиганда биополимером побуждает белок направленно изменить свою конформацию и перейти в новую структуру, резко отличающуюся от исходной. Такое изменение конформации называют направленным *конформационным переходом*. Способность к таким переходам может рассматриваться как второе широко распространенное свойство белков, необходимое для выполнения их биологических функций.

В ряде случаев белки проявляют свою активность при наличии в их составе определенных компонентов, связанных с белковой молекулой. Это можно продемонстрировать на примере уже упоминавшегося гема. Известно большое число комплексов белков с гемом и некоторыми его структурными аналогами, которые объединяются под общим названием *гемопротеиды*. Центральный атом железа в геме способен образовывать шесть связей. Четыре из них расположены в плоскости гема и соединяют атом железа с четырьмя атомами азота плоской структуры порфиринового кольца, а пятая и шестая находятся перпендикулярно по обе стороны плоскости порфиринового цикла и могут давать дополнительные связи с определенными лигандами. Атом железа в геме может менять степень окисления и быть либо в ферроформе Fe^{2+}, либо в ферриформе Fe^{3+} и таким образом играть роль переносчика электронов и участвовать в окислительно-восстановительных процессах. Атом кислорода, принимая участие в процессе окисления, может изменить степень окисления железа до Fe (IV) или Fe(V). Если гем связан в комплекс со специфичным белком, это приводит к резкому усилению одной из выполняемых гемом функции. Например, образование комплекса с белком глобином (*гемоглобин*) усиливает координирующую способность гема, в особенности способность координировать молекулу O_2. Гемоглобин обратимо связывает кислород, который выступает в качестве одного из лигандов, и таким образом служит переносчиком кислорода в многоклеточных организмах. У высших позвоночных гемоглобин находится в специальных красных кровяных клетках (*эритроцитах*), которые сорбируют кислород в легких и доставляют его ко всем органам и тканям с током крови.

Гемопротеидом является и *цитохром* c, образованный небольшим белком, ковалентно связанным с гемом. Цитохром с осуществляет перенос электронов на кислород в важнейшем процессе окисления органических соединений, присущий всем аэробным организмам. *Каталаза* — фермент, катализирующий расщепление пероксида водорода до O_2 и H_2O, — также является комплексом белка с гемом

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (I.1)$$

Каталаза защищает живые организмы от повреждения высокореакционноспособным пероксидом водорода, который образуется в живых организмах при некоторых реакциях окисления или получается из еще более опасного окислителя—супероксид-радикала, также образующегося в некоторых ферментативных процессах. Интересным ферментативным комплексом является так называемый *цитохром P450*. Центральный атом железа в геме реагирует с O_2 с образованием Fe(V) и включает атом кислорода в одну или несколько C—H-связей субстрата, превращая их в C—O—H-группы. Цитохром P450 осуществляет таким путем гидроксилирование различных чуждых организму липофильных соединений, например лекарственных препаратов, усиливая их гидрофильность, что облегчает их вывод из организма. Кроме того, цитохром P450 участвует в биосинтезе большого числа жизненно необходимых метаболитов.

Все сказанное про гемопротеиды наглядно иллюстрирует одно из важнейших свойств белков — способность организовывать функционирование связанных с ними низкомолекулярных соединений в одном из присущих этим соединениям направлении.

Развитие и размножение живых организмов сопровождается синтезом *de novo* большого набора белков и, следовательно, полипептидов, присущих данному организму. Это означает, что должны быть механизмы, которые обеспечивают синтез белков со строго определенным порядком расположения аминокислот. Теоретически нельзя исключить, что белок может управлять сборкой аминокислот в полипептидные цепи с аминокислотной последовательностью, точно такой же, как и в данном белке. Однако нет ни экспериментальных данных, ни физико-химических аргументов, свидетельствующих в пользу существования такого механизма. Все живые организмы содержат в качестве обязательных компонентов другой тип полимерных молекул — нуклеиновые кислоты, которые содержат информацию об аминокислотной последовательности всего набора белковых молекул, присущих данному организму.

Нуклеиновые кислоты являются линейными полимерами, состоящими из другого типа мономерных компонентов — нуклеотидов. Таким образом, с химической точки зрения, они являются полинуклеотидами. Имеется два класса нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК). Различие между структурой мономерных компонентов ДНК (дезоксирибонуклеотидов) и РНК (рибонуклеотидов) мало, и оба типа нуклеиновых кислот обладают многими общими свойствами. Однако эти различия очень значительны для проявления функциональных особенностей этих полимерных молекул. И ДНК, и РНК построены из четырех различных нуклеотидов. Различные нуклеиновые кислоты отличаются числом мономерных компонентов, количеством каждого из четырех нуклеотидов и их последовательностью.

Молекулы ДНК в клетке являются первичным носителем наследственной информации у всех живых организмов. Неповрежденные полинуклеотидные цепи ДНК в живых организмах значительно длиннее полипептидных цепей белковых молекул. Даже ДНК микроорганизмов содержат миллионы нуклеотидов. Следовательно, мыслимое число молекул ДНК значительно больше, чем для

белков. Роль ДНК как носителя наследственной информации была открыта в 50-х годах. В 1953 г. Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком были установлены основные принципы пространственной структуры ДНК и на их основе объяснена способность хранить, умножать и реализовывать заложенную в нее информацию. Это было одним из самых выдающихся достижений естествознания второй половины XX в.

Химическая структура нуклеиновых кислот будет описана в § 2.3. Здесь же уместно кратко описать основные принципы, заложенные в структуре молекулы ДНК, которые обеспечивают возможность самокопирования ДНК независимо от нуклеотидной последовательности. При делении клетки информацию, заложенную в молекулах ДНК этой клетки в виде определенной последовательности нуклеотидов, необходимо передать двум вновь образованным дочерним клеткам. Поэтому из одной молекулы ДНК перед клеточным делением должно образоваться две с той же нуклеотидной последовательностью. В живых организмах ДНК в период между ее удвоением всегда существует в виде двух связанных друг с другом полинуклеотидных цепей (нитей). Связь эта осуществляется в результате того, что каждый из четырех составляющих ДНК типов нуклеотидов резко предпочтительно взаимодействует с одним из трех остальных. Поэтому нуклеотидные последовательности этих нитей взаимно однозначно соответствуют друг другу, или, как принято говорить, комплементарны друг другу. Следовательно, каждая цепь содержит информацию о *комплементарной нуклеотидной последовательности* другой цепи. Будучи разделенными, цепи сохраняют необходимую информацию для построения из нуклеотидов новых комплементарных цепей и, таким образом, осуществляют воспроизведение информации, заложенной в двуспиральной структуре. Процесс самоудвоения ДНК, т.е. образования двух новых двунитиевых молекул ДНК, идентичных первоначальной молекуле, называют *репликацией ДНК*. Химические события, лежащие в процессе репликации, состоят в последовательном присоединении нуклеотидов друг к другу. Этот процесс в живых организмах осуществляет специальный фермент — *ДНК-полимераза*. Изучение свойств и механизмов функционирования этого фермента в клетке показало, что он работает только в присутствии материнской двуспиральной ДНК. Цепи материнской ДНК направляют образование новых комплементарных цепей, т.е. на каждой стадии роста новой цепи осуществляют отбор одного из четырех мономеров и присоединения его к растущей цепи.

Как уже говорилось, в ДНК содержится информация, необходимая для синтеза всего набора белков, присущего данному организму. Аминокислотная последовательность в ДНК записана с помощью специального кода. Кодирующим элементом для каждой определенной аминокислоты является тридезоксирибонуклеотидный фрагмент. Общее число таких кодирующих элементов составляет величину, равную $4^3 = 64$, что превышает число аминокислот, участвующих в биосинтезе белков. Как уже говорилось, все белки живых организмов строятся из 20 аминокислот. Таким образом, некоторые аминокислоты имеют несколько кодирующих элементов — от одного до шести. Соответствие между аминокислотами и кодирующими их тринуклеотидами называют *генетическим кодом*.

Однако ДНК не принимает непосредственного участия в управлении образованием новых полипептидных цепей. Эту роль выполняет другой тип нуклеиновых кислот, называемый рибонуклеиновыми кислотами или РНК. Соответствующая часть ДНК, которая содержит информацию о некоторой определенной аминокислотной последовательности, переписывается в определенную последовательность кодирующих элементов, построенных из рибонуклеотидов. Этот процесс называют *транскрипцией* и осуществляют с помощью специального фермента, называемого *РНК-полимеразой*. Молекулы РНК транскрибируются с определенных участков молекулы ДНК и переписывают информацию об аминокислотной последовательности определенных полипептидов для синтеза новых полипептидных цепей. Таким образом, информация, заложенная в молекуле ДНК, передается с помощью специального посредника (мессенджера) — *информационной РНК* (мессенджер РНК, сокращенно *мРНК*).

Новые полипептидные цепи синтезируются на особых надмолекулярных структурах — *рибосомах*. Каждая рибосама содержит несколько молекул РНК — *рибосомных РНК (рРНК)* — и значительное число различных белков. На рибосомах информация, заложенная в молекуле мРНК в форме последовательности кодирующих тринуклеотидных звеньев (*кодонов*), переводится на язык аминокислотной последовательности. Синтез белков на рибосомах называют *трансляцией*. Основные процессы хранения, умножения и реализации наследственной информации — репликация, транскрипция и трансляция — будут описаны в гл. 5.

Кроме мРНК, которая переносит генетическую информацию, и рРНК, которая принимает участие в формировании и функционировании рибосом, имеется третий тип рибонуклеиновых кислот — *транспортные рибонуклеиновые кислоты (тРНК)* — обязательные участники процесса трансляции. Каждой аминокислоте соответствует как минимум одна определенная тРНК, поскольку аминокислота, участвующая в биосинтезе белка, должна быть доставлена к рибосомам будучи присоединенной к соответствующей молекуле тРНК. Именно тРНК, несущая аминокислоту, а не сама аминокислота узнает на рибосомах кодирующий элемент мРНК.

Особое значение имеют изменения, которые могут происходить в структуре ДНК вследствие некоторых природных воздействий или в результате ошибок репликации. Эти изменения во многих случаях могут приводить к различным биологическим последствиям. Например, замена одного нуклеотида в некотором кодирующем элементе может привести к замене аминокислоты в белке. Такие унаследованные изменения в структуре ДНК называют *мутациями*. Как уже ранее говорилось, это может приводить к значительным изменениям пространственной структуры кодируемого белка и его способности к узнаванию соответствующих партнеров. В большинстве случаев результат такого повреждения или не имеет существенных биологических последствий, или приводит к потере способности воспроизводить потомство и имеет значение только для данного индивидуума. Однако в некоторых редких случаях изменение структуры может дать потомству определенные преимущества и закрепиться в популяции. Поэтому мутации являются первичным актом эволюции живых организмов.

Из предыдущего рассмотрения видно, что белки и нуклеиновые кислоты представляют собой органические соединения высокого уровня организации. Хотя, естественно, они не являются "живыми" молекулами, но их появление на Земле было предпосылкой образования первых живых организмов. Поэтому их можно рассматривать как молекулярную основу организации жизни. В связи с этим область науки, имеющая дело с изучением структуры этих молекул, их комплексов и их поведения в биологических системах, получила название *молекулярной биологии*.

1.2. КЛЕТКА — ОСНОВНОЙ СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЖИВОЙ МАТЕРИИ. КЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ЖИЗНИ

Клетки являются обязательными структурными единицами всех известных живых организмов. Этот принцип был сформулирован в 1837—1839 гг. Матиасом Шлейденом и Теодором Шванном. Он является основным положением *клеточной теории*, одной из наиболее фундаментальных теорий биологии. В 1855 г. она была дополнена другим правилом (законом), постулированным Рудольфом Вирховом, а именно: каждая клетка образуется только из клетки.

Клетки являются определенными структурными единицами, содержащими белки, нуклеиновые кислоты и ряд более простых химических веществ, которые отделены от окружающей среды и близлежащих клеток *клеточной мембраной*, легко проницаемой только для очень маленьких незаряженных частиц. Такая мембрана состоит главным образом из специализированных гидрофобных молекул — липидов, в первую очередь из фосфолипидов и ряда белков, участвующих в обмене веществ, энергии и информации между клеточным содержимым и окружающей средой. Механическая прочность фосфолипидной мембраны невысока, и внешняя поверхность большинства клеток растений и бактерий защищена специальной *клеточной стенкой*, построенной из полисахаридов или комплекса полимерных соединений, содержащих как полисахариды, так и полипептидные цепи — протеогликаны. Область науки, изучающая клетки, их структуру и функции, традиционно называлась *Цитология*. В настоящее время ее чаще всего называют *Клеточной биологией*.

Миллионы лет назад клетки образовались из более простых структур, вероятно, из древних белков, нуклеиновых кислот и их комплексов. Остается неизвестным, что же послужило предпосылкой этой стадии в эволюции материи. Возможно, для этого были необходимы какие-то специальные полимерные структуры, в настоящее время на Земле отсутствующие. Не исключено также, что они возникли из структур, похожих на современные белки и нуклеиновые кислоты, но были необходимы специфические условия для того, чтобы они смогли организоваться в примитивные клетки, способные к воспроизводству. И наконец, не исключено также и то, что и необходимые вещества, и специальные условия существуют до сих пор где-либо на Земле. Однако в настоящее время невозможно наблюдать образование клеток даже при использовании современных экспериментальных подходов из-за присутствия в окружающей среде огромного числа одноклеточных организмов и их непрерывного воспроизводства. Теория зарождения жизни до сих пор продолжает оставаться одной из наиболее загадочных проблем биологии. Эта теория должна ответить в первую очередь на два основных вопроса: первый — каким образом набор полимерных и низкомолекулярных веществ появился в ходе химической эволюции; второй — как эти вещества сумели объединиться в первые живые клеточные организмы.

Клетки необычайно разнообразны по своим размерам, формам, внутренней структуре и функциям. Огромное разнообразие клеток существует в виде одноклеточных организмов с разнообразными уровнями сложности. В многоклеточных организмах клетки специализированы: следовательно, огромное число различных типов клеток может существовать внутри одного организма. В организме человека число типов клеток превышает двести.

Основным признаком живой материи является воспроизводство. Жизнь на

Земле продолжается и эволюционирует в первую очередь благодаря непрерывному воспроизводству живых организмов. Размножение одноклеточного организма происходит главным образом посредством клеточного деления. Многоклеточные организмы зарождаются из единственной клетки, обычно из оплодотворенного яйца. Дальнейшее развитие организма происходит в значительной степени путем ряда делений, сопровождающихся последовательным изменением клеток от поколения к поколению, приводящим к высокоспециализированным клеткам.

Этот процесс известен как *клеточная дифференцировка*. По окончании дифференцировки клетки могут терять способность к делению и в течение всего периода их жизни осуществляют одну или несколько определенных функций. Например, нейроны не делятся, а только передают сигналы от мозга в различные точки многоклеточного организма.

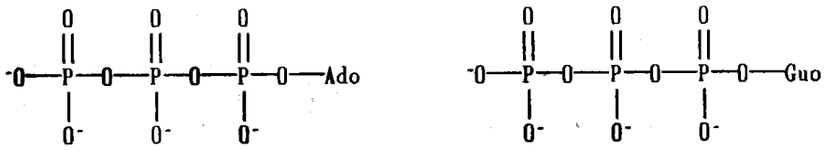
Информация, необходимая как для получения двух дочерних клеток, идентичных с материнской, так и для запрограммированных изменений в случае дифференцировки, поставляется молекулами ДНК. Кроме информации растущим, делящимся и функционирующим клеткам необходимы специфические вещества и энергия. Все это поставляется специфическими биохимическими и биофизическими процессами, протекающими в клетке, в некоторых случаях при участии клеточной мембраны.

Обязательным процессом, происходящим при клеточном делении одноклеточных организмов, является репликация ДНК. Это справедливо также практически во всех случаях клеточного деления многоклеточных организмов. Обычно процесс требует также увеличения количества РНК и белковых молекул. Все эти биополимеры могут быть синтезированы из соответствующих мономеров внутри клетки в соответствии с клеточными программами. Синтез белков и РНК *de novo* обычно необходим и для функционирования неделящихся клеток. Кроме того, в таких клетках может также происходить синтез ДНК для того, чтобы реставрировать повреждения молекул ДНК, полученные вследствие действия различных химических и физических факторов, — так называемая *репарация* ДНК. Все эти процессы должны быть обеспечены соответствующими мономерами. Мономеры могут быть получены как из клетки, так и из окружающей среды. Получение мономеров внутри клетки возможно двумя противоположными способами: биосинтезом, начинающимся из простых химических соединений, и гидролизом биополимеров, захваченных организмом. В обоих случаях необходимый материал должен быть перенесен из окружающей среды, а соответствующие химические превращения должны совершиться внутри клетки. Таким образом, основное свойство жизни требует, чтобы в клетке непрерывно происходили определенные химические превращения. Это, как правило, должно сопровождаться, во-первых, доставкой в клетку внешних материалов и, во-вторых, удалением из клетки побочных продуктов этих превращений. Следовательно, наследственные программы, присущие живым организмам, не могут быть реализованы без помощи ряда биохимических процессов, другими словами, без *метаболизма*.

Как образование новых пептидных связей между растущей полипептидной цепью и аминокислотой, так и присоединение нуклеотида к растущей полимерной цепи нуклеиновой кислоты сопровождается увеличением свободной энергии: $\Delta G > 0$. Соответственно биосинтез биополимеров должен обеспечиваться энергией. Получение и потребление энергии также базируется на ряде химических превращений и является второй главной задачей метаболизма.

Несомненно, роль как биосинтетических, так и биоэнергетических процессов не исчерпывается биосинтезом новых молекул биополимера. Чем более сложен живой организм, тем более разнообразны его потребности в разных химических соединениях. Рассмотрение наиболее важных метаболических процессов является основным содержанием этого учебника.

Источником непосредственно используемой энергии в подавляющем большинстве биологических процессов является гидролиз ангидридных связей в трифосфатных фрагментах нуклеозидтрифосфатов. В основном используется два нуклеозидтрифосфата, а именно содержащие аденозин и гуанозин в качестве нуклеозидных остатков. Обычно в химических формулах они обозначаются аббревиатурами Ado и Guo соответственно. В текстах *аденозинтрифосфат* и *гуанозинтрифосфат* обозначаются как АТФ и ГТФ:



Гидролиз любой из двух связей между ортофосфатными остатками при pH 7 и стандартных концентрациях компонентов сопровождается уменьшением свободной энергии приблизительно на 30 кДж/моль. При гидролизе связи, соединяющей α- и β-фосфатные остатки в молекуле АТФ, образуются пирофосфат и аденозинмонофосфат (АМФ). Гидролиз ангидридной связи между β- и γ-фосфатами типичен как для АТФ, так и для ГТФ и приводит к образованию ортофосфата и соответствующего нуклеозиддифосфата АДФ или ГДФ.

Тем не менее, для того чтобы иметь возможность повторно использовать получившиеся дифосфаты, они должны быть фосфорилированы по β-положению, а АМФ должен подвергнуться двойному фосфорилированию. Оба процесса протекают с $\Delta G > 0$ и требуют внешних источников энергии. На Земле существует два таких основных источника. Первым источником является солнечная радиация. В биосфере огромное число живых организмов (зеленые растения и цианобактерии) обладают специальной системой, способной использовать кванты солнечной энергии для переноса электронов от воды к CO_2. Начальной реакцией этого потока является фотохимический процесс

$$2H_2O \xrightarrow{h\nu} 4H^+ + 4e^- + O_2 \qquad (I.2)$$

Конечным процессом является образование углеводов из CO_2 в соответствии со стехиометрическим уравнением

$$6CO_2 + 24H^+ + 24\,e^- \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \qquad (I.3)$$

На первой стадии энергия, переносимая электроном, используется специализированной мембранной системой для фосфорилирования АДФ. Весь процесс называют *фотосинтезом*, а превращение АДФ в АТФ в этой системе — *фотосинтетическим фосфорилированием*. Помимо выработки АТФ фотосинтез обеспечивает биосферу и атмосферу органическими соединениями и кислородом.

Огромное число живых организмов не обладает системой для фотосинтеза и в качестве источника энергии использует процесс окисления органических соединений атмосферным кислородом, используя, таким образом, основные продукты фотосинтеза. В этих живых организмах поток электронов противоположен потоку при фотосинтезе. На определенных стадиях часть энергии, получающейся при окислении, используется для фосфорилирования. В этом случае процесс называют *окислительным фосфорилированием*. Он будет подробно рассмотрен в гл. 8.

Все типы существующих клеток делят на два основных класса: *прокариотические* и *эукариотические*. Наиболее замечательная особенность последних заключается в наличии специальной внутриклеточной структуры — *ядра*, которое содержит преобладающую часть ДНК и, следовательно, наследственную информацию. Ядро отделено от внутреннего содержания клетки — *цитоплазмы* — *ядерной мембраной*. Кроме ДНК ядро содержит ряд белков, в первую очередь тех, которые участвуют в репликации и транскрипции, а также необходимы для деления клеток. В ядре эукариотических клеток ДНК существует в форме специальных органелл — *хромосом*. Эти органеллы можно увидеть в световом микроскопе на определенной стадии деления клетки.

В более примитивных прокариотических клетках ДНК не выделяется специальной дополнительной мембраной. Обычно эти клетки содержат одну гигантскую молекулу двуспиральной ДНК, состоящую из нескольких миллионов нуклеотидов. Иногда, по аналогии с эукариотической клеткой, ее называют хромосомной ДНК. В некоторых случаях в прокариотических клетках, в дополнение к этой ДНК, присутствуют еще и относительно маленькие молекулы ДНК (длиной в несколько тысяч нуклеотидов), несущие дополнительную информацию; их называют *плазмидами*. В большинстве случаев плазмиды копируются независимо от хромосомной ДНК и клетки могут содержать ряд подобных молекул. Несмотря на маленькие размеры, они придают клетке ряд особенностей, чрезвычайно важных для их выживания, например устойчивость к определенным антибиотикам. Прокариотические клетки обладают относительно маленькими размерами. Их линейные размеры имеют порядок 1 мкм, а самые маленькие из известных прокариотических клеток — *микоплазмы* — имеют размер около 0,3 мкм. Все прокариотические клетки могут функционировать независимо и, следовательно, должны рассматриваться как одноклеточные живые организмы (*прокариоты*). К этой группе живых организмов относят микоплазмы, бактерии и синезеленые водоросли (цианобактерии). Бактерии можно разделить на две основные группы: эубактерии (действительные бактерии) и .архебактерии. К последним относят микроорганизмы, живущие в экстремальных условиях — в горячей или сильнокислотной среде (термоацидофилы), в концентрированных соляных растворах (галофилы) и др. Условия жизни архебактерий, по-видимому, достаточно близки к тем, которые существовали на Земле в период зарождения жизни.

Эукариотические клетки обладают существенно большими размерами, и обычно их линейные размеры колеблются в пределах 10—30 мкм. В особых случаях они еще существенно больше. Так, гигантская средиземноморская водоросль *Acetobularia* может достигать длины нескольких метров. Нейроны, которые проводят сигналы от мозга к различным точкам, могут быть длиной в несколько метров.

Существует ряд важных одноклеточных эукариотических организмов. К ним относят все *Protozoa* (амебы, инфузории и др.), дрожжи, одноклеточные водоросли,— например, хлорелла. Внутреннее устройство эукариотической клетки несравнимо сложнее, чем у прокариотов. Главные особенности этих структур будут

рассмотрены в гл. 2. В противоположность прокариотам эукариотические клетки способны образовывать многоклеточные организмы с разнообразной специализацией клеток различных типов. Наиболее существенные особенности многоклеточных организмов, необходимые для рассмотрения следующего материала по биохимии, будут представлены в § 1.4.

Утверждение о том, что клетки действуют в соответствии со своей наследственной программой, не вполне корректно. Многие клетки могут быть инфицированы особыми частицами, содержащими свою собственную программу как в виде молекулы ДНК, так и в виде молекулы РНК. Такие частицы называют *вирусами*. Кроме нуклеиновых кислот вирусы содержат специфические белки, а в некоторых случаях и фосфолипидные мембраны. После проникновения в клетку вирусы запускают биохимический аппарат клетки в основном на производство вирусных нуклеиновых кислот и белков и в конечном счете на образование новых вирусных частиц, сопровождающееся в основном разрушением клетки. Различные вирусы могут инфицировать клетки животных, растений, микроорганизмов. Вирусы, инфицирующие микроорганизмы, обычно называют *бактериофагами*. Общие принципы строения и основные типы вирусных структур будут рассмотрены в § 3.8 , а механизмы размножения внутри клетки — в § 5.7.

В ряде случаев, особенно у растений, клетки могут инфицироваться молекулами РНК без участия белков. Некоторые из них способны воспроизводиться внутри клетки сами по себе, используя внутриклеточные биохимические механизмы. Такие инфицирующие РНК называют *вироидами*. Другие типы могут воспроизводиться только при одновременном присутствии в зараженной клетке определенных вирусов, их называют *вирусоидами*. Принципы действия и тех, и других исследованы много хуже, чем вирусов.

1.3. ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Основным признаком эукариотической клетки является наличие ядра, содержащего преобладающую часть клеточной ДНК. Эта ДНК существует в виде многокомпонентного комплекса с большим набором белков, называемого *хроматином*. Обычно ядро содержит несколько огромных двуспиральных молекул ДНК, каждая из которых состоит из десятков или даже нескольких сотен миллионов нуклеотидов. На определенных стадиях, предшествующих клеточному делению, хроматин конденсируется и в световой микроскоп можно наблюдать характерные структуры. Эти структуры называют *хромосомами*; они были обнаружены задолго до того, как ученые узнали, что ДНК является важнейшим переносчиком наследственной информации. В конце XIX в. было открыто, что число хромосом удваивается с образованием пар идентичных хромосом непосредственно перед делением клетки. Таким образом, Томас Морган постулировал, что хромосомы являются основными структурами, отвечающими за наследственность. *Хромосомная теория наследственности* является одной из основных теорий *генетики* — биологической дисциплины, изучающей наследственность живых организмов. Общепризнано, что хромосомы не образуются *de novo* при конденсации хроматина, а существуют в виде определенных органелл во все время жизни клетки, правда в довольно диффузной форме.

Половое размножение является наиболее типичным для эукариотических организмов, особенно для многоклеточных. Сперматозоид и неоплодотворенное яйцо содержат один набор хромосом, их называют *гаплоидными клетками*. Оплодотворение приводит к образованию *диплоидной клетки*, содержащей два набора хромосом. Все последующие деления протекают в основном с сохранением диплоидного типа клеток потомства. Этот тип деления называют *митозом*. Несомненно, митоз должен включать в себя удвоение хромосом как обязательную стадию. Число хромосом является определенным для каждого вида. Например, диплоидные клетки дрожжей содержат 4 пары хромосом, диплоидные человеческие клетки — 23 пары хромосом с общим числом остатков нуклеотидов $1{,}2 \cdot 10^{10}$($3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов на гаплоидный набор).

Клеточный цикл эукариотических клеток, подвергающихся последовательным *митотическим делениям*, состоит из двух основных периодов. Первая стадия, называемая *интерфазой*, заключается в накоплении химических соединений необходимых для деления. Обычно в интерфазе выделяется две фазы: G и S G-фаза создает предпосылки, необходимые для последующего деления. Во время фазы S происходит репликация и, таким образом, все хромосомные ДНК появляются в виде двух идентичных двуцепочечных копий. За интерфазой после короткой промежуточной фазы начинается митоз. Первая фаза митоза (*профаза*) заключается в образовании двух четко очерченных дочерних хромосом, соединенных в их центральной части — центрамерном районе. Эти структуры называют *хроматидами*. Необходимо отметить, что конденсация происходит одновременно с разрушением ядерной мембраны. После образования хроматид на следующей стадии (*метафазе*) они движутся к середине делящейся клетки и собираются все на одной плоскости. На этой стадии хромосомы теряют все мембранное окружение. Потом все пары начинают разделяться, двигаясь к полюсам материнской клетки (*анафаза*). Как только хромосомы собираются у соответствующих полюсов, начинается их деконденсация. Это сопровождается сборкой новых ядерных мембран и образованием двух новых ядер (*телофаза*). Конечная стадия митоза заключается в разделении цитоплазмы и, соответственно, образовании двух разделенных дочерних клеток.

Наличие ядра является главной, но не единственной структурной особенностью эукариотических клеток. В цитоплазме существует ряд других внутриклеточных органелл, окруженных своими собственными мембранами. Окислительное фосфорилирование и ряд предшествующих стадий окисления органических соединений протекают в *митохондриях*. Эти органеллы окружены двумя фосфолипидными мембранами. Внутренняя мембрана, построенная из специфических белков, участвует в сопряжении переноса электронов от органических соединений к кислороду с фосфорилированием АДФ. Еще более сложными органеллами являются *хлоропласты*, в которых проходят все стадии фотосинтеза. Уникальной особенностью этих двух типов органелл является то, что они содержат ДНК, которая реплицируется перед их делением и несет информацию о некоторых белках и РНК, необходимых для формирования и функционирования этих органелл. Тем не менее бо́льшая часть информации, необходимой для производства всего набора как митохондриальных, так и хлоропластных белков, находится в хромосомной ДНК.

Внутренняя цитоплазматическая мембрана не только окружает митохондрии и хлоропласты, но также образует исключительно сложную сеть — *эндоплазматический ретикулум*. Эта сеть участвует в различных внутриклеточных транспортных процессах, а также в образовании специальных отделений — компартментов,

которые обеспечивают пространственное разделение (*компартментализацию*) биохимических процессов. Эта сеть играет существенную роль в транспорте белков к поверхности клеток, чтобы обеспечить возможность их встраивания во внешнюю мембрану или выделения (секреции) в окружающую среду.

Вследствие относительно больших размеров эукариотические клетки нуждаются в некоторой внутренней жесткости. В большей степени эта жесткость обеспечивается *цитоскелетом*, образованным специальными белковыми трубочками и волокнами. Кроме того, сокращение волокон играет важную роль как во внешних движениях клеток, так и различных перемещениях внутри клеток. Подобные движения являются, в частности, необходимыми в уже описанном движении хромосом от центра молекулы к полюсам при делении клеток.

Роль некоторых из приведенных выше структурных элементов в пространственной организации биохимических процессов будет обсуждена более детально в гл. 10.

1.4. МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Изучение многоклеточных организмов является объектом одной из главных областей биологии — *Физиологии*. Существуют чрезвычайно сильные отличия между принципами структурной организации и функционирования многоклеточных растений и животных. Поэтому физиология растений и физиология животных и человека рассматриваются обычно как две совершенно различные области биологии.

Основной чертой многоклеточного организма является распределение функций между различными типами клеток. В ходе эволюции это распределение становилось все более и более существенным, пока не достигло наивысшего уровня у млекопитающих, включая человека. Высокоспециализированные клетки многоклеточных организмов формируют различные ткани, которые, в свою очередь, образуют всевозможные органы. В тканях клетки находятся в контакте со сложной сетью межклеточных полимеров, в первую очередь специальных белков и полисахаридов, образуя *внеклеточный матрикс*. В ряде случаев клетки соприкасаются непосредственно друг с другом. В многоклеточных организмах как процессы воспроизводства, так и метаболизм, включая производство энергии, протекают несравнимо сложнее, чем в одноклеточных.

Так, метаболизм высших животных, включая человека, обеспечивается сложной системой органов. Усвоение пищи происходит в системе пищеварительных органов, которая включает в себя ротовую полость, пищевод, желудок и кишечник. В процессе пищеварения участвуют поджелудочная железа, которая обеспечивает систему рядом пищеварительных ферментов, и печень, которая продуцирует желчь, необходимую для переваривания жиров. В этой системе все полимерные и другие сложные химические соединения превращаются в более простые вещества, которые могут поступать в кровь для того, чтобы быть доставленными ко всем другим органам. Кровеносная система, кроме того, доставляет кислород, сорбированный эритроцитами в легких. Кишечник, почки и легкие участвуют также в выделении побочных продуктов (продуктов жизнедеятельности). Так, CO_2, образовавшийся при окислении ряда органических соединений, может быть мочой. Печень играет исключительно важную роль в удалении из организма токсических соединений.

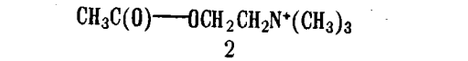
Чрезвычайно сложным является процесс размножения у высших животных. Соответствующая система органов служит для созревания сперматозоидов и яйцеклеток, для обеспечения их слияния во время оплодотворения, а в случае млекопитающих также для вынашивания плода и кормления новорожденных в ранний период жизни.

Даже ряд одноклеточных организмов обладает примитивной способностью двигаться в окружающей среде, которая у многоклеточных животных организмов несопоставимо более совершенна. Она обеспечивается специальной системой взаимодействующих подвижных элементов организма — мускулами и сочленениями (суставами), которые у позвоночных связаны с соответствующими элементами скелета. Кроме внешних движений многоклеточным организмам присущи разнообразные внутренние движения, например периодические сокращения сердца, приводящие к циркуляции крови по организму, перистальтика кишечника, ориентация в пространстве органов зрения, слуха и обоняния.

До сих пор здесь обсуждались функции, которые являются общими и для многоклеточных, и для одноклеточных организмов. Прежде всего это размножение, обмен веществ и производство энергии. Способность двигаться встречается не только у многоклеточных, но и ряда одноклеточных организмов. Но есть и ряд определенных функций, которые присущи только многоклеточным организмам. В первую очередь функции, обеспечивающие координацию деятельности многоклеточных организмов в целом. Главной регуляторной системой является система эндокринных желез. Эти железы вырабатывают специальные химические вещества, называемые *гормонами*, которые играют роль сигналов, посылаемых в определенных физиологических состояниях организма к соответствующим органам — мишеням. Основными эндокринными железами позвоночных являются поджелудочная железа, гипофиз, щитовидная железа, надпочечники, яичники и семенники.

Второй главной системой, присущей всем достаточно высокоразвитым животным, является нервная система. Эта система в сочетании с органами чувств получает разнообразную информацию от окружающей среды, превращает ее в сигналы, которые передаются исполнительным органам, например органам движения, или в форму, хранящуюся в коре головного мозга для дальнейшего применения. Основными элементами нервной системы являются *нейроны*. У позвоночных они сконцентрированы в мозге и соединяются практически со всеми частями организма специальным образом через аксоны, которые способны проводить электрические сигналы. Аксоны могут достигать нескольких метров в длину и способны передавать электрический сигнал со скоростью до нескольких метров в секунду. Переданные сигналы представляют собой локальное повышение межмембранного электрического напряжения во время движения по аксонам. Такое повышение (*потенциал действия*) может достигать нескольких десятков милливольт по сравнению с равновесным уровнем трансмембранного потенциала (*потенциал покоя*). Передача электрического сигнала при нервно-мышечном контакте, а также от нейрона к нейрону происходит в специализированных структурах, называемых *синапсами*. Они образуются соответствующими окончаниями взаимодействующих клеток, разделенными синаптической щелью. Получение сигнала приводит к

цептором принимающей клетки. Наиболее детально изученным является нейромедиатор *ацетилхолин*



действующий в нервно-мышечном синапсе. Известно, что ацетилхолиновый рецептор располагается на внешней мембране мышечной клетки, получающей сигнал.

Как уже отмечалось, специализированные клетки образуются из оплодотворенного яйца путем дифференцировки, что означает запрограммированный ряд делений клетки, приводящих к последовательным изменениям клеток после каждого деления. Например, источником эритроцитов в крови являются *стволовые клетки*, которые находятся в костном мозге. Эти клетки являются предшественниками целого ряда разнообразных клеток. Одним из таких типов являются эритроциты. Развитие стволовых клеток в этом направлении называют *эритропоэзом*. Превращение одной стволовой клетки в эритроциты требует 11 делений, давая, таким образом, 2^{11} (2000) высокоспециализированных клеток. Так как основная функция эритроцитов заключается в переносе кислорода, то зрелые эритроциты не делятся, а у млекопитающих даже теряют свои ядра. Незрелые эритроциты, известные как *ретикулоциты*, широко используются в молекулярной биологии в качестве источника эукариотических рибосом и других компонентов, участвующих в трансляции генетической информации. Ретикулоциты могут быть получены в достаточных количествах путем введения в кровь экспериментальных животных (обычно кроликов) фенилгидразина. Это приводит к разрушению эритроцитов, таким образом индуцируя интенсивную выработку ретикулоцитов.

Нормальное развитие многоклеточных организмов требует ограничения размеров каждого органа. По достижении определенного размера дальнейшее воспроизводство клеток, составляющих этот орган, должно быть остановлено. Некоторое число клеток может быть легко повреждено во время их функционирования, и их необходимо обновить (регенерировать). Тем не менее регенерация должна быть ограничена и скоординирована с требованиями соответствующей ткани или органа. Одним из наиболее ярких примеров регулируемой регенерации является регенерация печени. У позвоночных печень может быть отрезана до $^1/_3$ от нормального размера. Начинается интенсивная регенерация до достижения нормального размера, но не превышая его. Следовательно, должна существовать специальная программа, отвечающая и за стимуляцию роста клеток определенного типа, т.е. стимуляцию клеточного деления, и за прекращение этого деления. В последние годы ученые все более склоняются к тому, что одним из основных факторов, предотвращающих неограниченное размножение клеток, является специальная генетическая программа, предопределяющая конечное число делений, которые может претерпеть данная клетка. Эту программу иногда называют запрограммированной смертью клеток. По достижении этого числа делений клетки претерпевают сложную систему процессов деградации, называемую *апоптозом*. Очевидно, что нарушение программы, ответственной за регуляцию клеточного деления, должно приводить к неограниченному делению, что означает возникновение злокачественной опухоли.

С этой точки зрения, очень важной стадией в эволюции высших животных было появление *иммунной системы*. Именно

ошибки в процессе репликации составляет примерно 10^{-9}. Это означает, что в среднем одна из 1 млрд. клеток будет содержать ошибку. С большой вероятностью эта ошибка может повредить внутриклеточную систему, которая препятствует неограниченному делению, а следовательно, способствовать возникновению злокачественной опухоли. В случае многоклеточного организма, состоящего из более чем 1 млрд. клеток, необходимо избежать образования злокачественных опухолей по меньшей мере до достижения репродуктивного возраста. Например, число клеток у взрослого человека порядка 10^{14}. Следовательно, должна существовать специальная система для того, чтобы уничтожать неправильные клетки, которые появились из-за репликационных ошибок. Эту роль выполняет иммунная система.

Иммунная система млекопитающих состоит из тимуса, селезенки и сети лимфатических узлов, соединенной с кровеносной системой. Элементами, которые осуществляют иммунологическое наблюдение за организмом, являются специальные клетки иммунной системы — *лимфоциты*. Так же как и эритроциты, они происходят из стволовых клеток костного мозга, но развиваются согласно другой программе — *лимфопоэзу*.

Иммунная система обладает уникальной способностью отвечать на появление чужеродных частиц выработкой огромного числа лимфоцитов, способных специфически повреждать именно эти частицы. Этими частицами могут быть чужеродные клетки, например патогенные бактерии, ошибочно измененные клетки организма, включая те, которые вызывают злокачественные новообразования, надмолекулярные частицы, такие, как вирусы, макромолекулы, включая чужеродные организму белки. Одна из групп лимфоцитов, так называемые *Т-лимфоциты*, представляет собой популяцию лимфоцитов, производство которых контролируется тимусом. Одна субпопуляция Т-лимфоцитов, называемая *Т-киллерами*, непосредственно узнает чужеродные частицы и участвует в их уничтожении. Другая группа, называемая *В-лимфоцитами*, продуцирует особые белки, выделяемые в кровеносную систему, которые узнают чужеродные частицы, образуя высокоспецифичный комплекс на первой стадии их уничтожения. Эти белки называют *иммуноглобулинами*. Чужеродные вещества, которые вызывают иммунный ответ, обычно называют *антигенами*, а соответствующие иммуноглобулины — *антителами*. Установлено, что каждый В-лимфоцит продуцирует только один тип антител. Следовательно, предполагается, что все В-лимфоциты, продуцирующие идентичные антитела, происходят из одной родительской клетки, образуя, таким образом, один клон. Стимулирование интенсивного деления такой клетки является ответом на появление определенного антигена. Следует отметить, что это деление хотя и интенсивно, но всегда ограничено и, видимо, общее число В-лимфоцитов, продуцирующих определенный тип антител, подвергается регуляции подобно тому, как регулируется рост определенного органа, будь то развитие или регенерация. Прекращение регуляции приводит к неограниченному росту клона, что наблюдается в случае злокачественного заболевания иммунной системы, называемого *миеломой*. Это приводит к сверхпродукции определенного вида иммуноглобулина.

Следует в заключение отметить, что иммунная система, в первую очередь ее способность производить иммуноглобулины, предоставляет биохимикам незаменимый материал для исследования. Некоторые аспекты получения и применения

ГЛАВА 2

ГЛАВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

2.1. БЕЛКИ И ИХ ГЛАВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

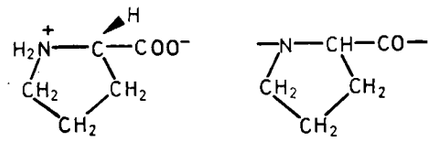
Большинство наиболее тонких биологических функций выполняется белками или по меньшей мере при их непосредственном участии. Белки представляют собой полимеры, построенные из α-аминокислот, общую формулу которых в водном растворе при значениях pH, близких к нейтральным, можно записать в виде $NH_3^+CHRCOO^-$.

Остатки аминокислот в белках соединены между собой амидными связями между α-амино- и α-карбоксильной группами. Общая структура одной полимерной цепи белковой молекулы может быть представлена в виде

$$NH_3^+CHR^{(1)}CO{-}NHCHR^{(2)}CO{-}NHCHR^{(3)}CO{-}\ \ldots\ {-}NHCHR^{(n-1)}CO{-}NHCHR^{(n)}COO^-$$

Амидная связь между двумя α-аминокислотными остатками обычно называется *пептидной связью*, а полимеры, построенные из остатков α-аминокислот, соединенных пептидными связями, называют *полипептидами*. Белок, как биологически значимая структура, может представлять собой как один полипептид, так и несколько полипептидов, образующих в результате нековалентных взаимодействий единый комплекс, а иногда дополнительно связанных между собой ковалентными сшивками.

В состав белков входит множество различных аминокислот, отличающихся строением радикала R. Главными из них являются девятнадцать аминокислот, приведенных в табл. 2.1 как фрагмент полипептидной цепи*, а также иминокислота *пролин*:



*При дальнейшем изложении структурные формулы аминокислотных фрагментов в составе полипептидных цепей будут изображаться в соответствии с правилами, принятыми для проекций Фишера, но в предположении, что главной цепью является не углеродный

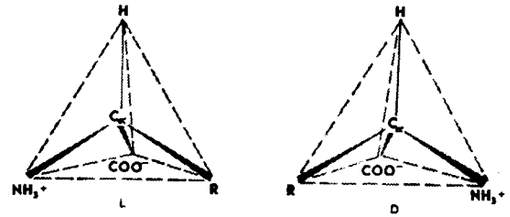


Рис. 1. L- и D-изомеры α-аминокислот

Все α-аминокислоты, кроме простейшей аминоуксусной кислоты — глицина ($NH_3^+CH_2COO^-$), имеют хиральный атом C^α и могут существовать в виде двух энантиомеров. В состав всех изученных в настоящее время белков входят только аминокислоты L-ряда, у которых, если рассматривать хиральный атом C^α со стороны атома H, группы NH_3^+, COO^- и радикал R расположены по часовой стрелке (рис. 1). Соответственно если рассматривать C^α со стороны радикала R, то связанные с ним атомы H, C и N расположатся также по часовой стрелке. Необходимость при построении биологически значимой полимерной молекулы строить каждое ее звено из строго определенного энантиомера очевидна — из смеси двух энантиомеров получалась бы невообразимо сложная смесь диастереомеров. Вопрос, почему жизнь на Земле основана на белках, построенных именно из L-, а не D-α-аминокислот, до сих пор остается интригующей загадкой. Следует отметить, что D-аминокислоты достаточно широко распространены в живой природе и, более того, входят в состав ряда биологически значимых коротких олигопептидов.

Любой функционально значимый белок представляет собой в очищенном виде индивидуальное вещество, состоящее из идентичных молекул, не только содержащих один и тот же набор различных аминокислотных остатков и одинаковое число остатков каждого вида, но и характеризующихся одной и той же последовательностью, в которой эти остатки собраны в линейную полипептидную цепь. Эту последовательность называют *первичной структурой* белка. К настоящему времени установлены последовательности аминокислот для нескольких тысяч различных белков. Запись структуры белков в виде развернутых структурных формул громоздка и не наглядна, поскольку многие белки построены из сотен аминокислотных остатков. Поэтому в химии белка широко используется сокращенная форма записи аминокислотных остатков — трехбуквенная или однобуквенная. Сокращения для всех двадцати главных мономерных компонентов белковой молекулы приведены в табл. 2.1. При записи последовательности аминокислот в полипептидных или олигопептидных цепях с помощью сокращенной символики предполагается, если это особо не оговорено, что α-аминогруппа находится слева, а α-карбоксильная группа — справа от символа, т.е. полипептидная цепь начинается с остатка, имеющего свободную α-аминогруппу, и заканчивается остатком, имеющим свободную карбоксильную группу. Соответствующие участки полипептидной цепи называют N-концом и C-концом или карбоксильным концом полипептидной цепи, а аминокислотные остатки — соответственно N-концевым и C-концевым остатками.

В качестве примера использования сокращенной символики и для демонстрации ее преимуществ на рис. 2 приведены структуры гормона вазопрессина.

Таблица 2.1. Аминокислоты, входящие в состав белков

Название	Структура радикала R_i	Обозначение	
	$^+NH_3-CH(R_i)-COO^-$	трехбуквенное	однобуквенное
Глицин	$-H$	Gly	G
Аланин	$-CH_3$	Ala	A
Валин	$-CH(CH_3)_2$	Val	V
Лейцин	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	Leu	L
Изолейцин	$-CH(CH_3)-CH_2CH_3$	Ile	I
Метионин	$-CH_2CH_2-S-CH_3$	Met	M
Серин	$-CH_2OH$	Ser	S
Треонин	$-CHOH-CH_3$	Thr	T
Цистеин	$-CH_2SH$	Cys	C
Фенилаланин	$-CH_2-C_6H_5$	Phe	F
Тирозин	$-CH_2-C_6H_4-OH$	Tyr	Y
Триптофан	$-CH_2-C_8H_6N$	Trp	W
Аспартат	$-CH_2-COO^-$	Asp	D
Глутамат	$-CH_2-CH_2-COO^-$	Glu	E
Аспарагин	$-CH_2-CONH_2$	Asn	N
Глутамин	$-CH_2-CH_2-CONH_2$	Gln	Q
Гистидин	$-CH_2-C_3H_3N_2$	His	H
Лизин	$-(CH_2)_4-NH_3^+$	Lys	K
Аргинин	$-(CH_2)_3-NH-C(=NH_2^+)-NH_2$	Arg	R
Иминокислота пролин	C_4H_7N	Pro	P

который производится гипофизом и регулирует кровяное давление, сужая капил-
ляры и усиливая ресорбцию воды в почках.

Как уже отмечалось, принцип построения белковых молекул обеспечива

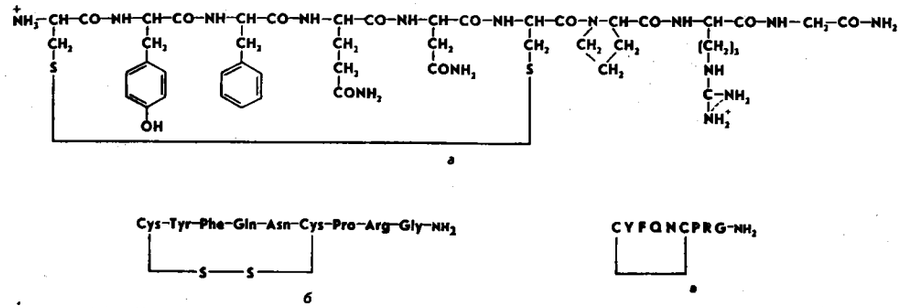


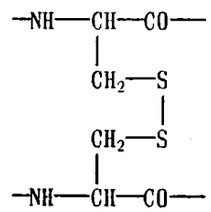
Рис. 2. Молекула вазопрессина:

а — в виде структурной формулы; *б* — записанная с помощью трехбуквенной символики; *в* — записанная с помощью однобуквенной символики. Линия, соединяющая символы остатков цистеина в формулах *б*, *в*, означает наличие между ними дисульфидного мостика; С — концевая карбоксильная группа аминокислоты амидирована

означает, что за всю историю существования жизни на Земле могла появиться, быть проверена на «полезность» и отобрана в процессе эволюции лишь ничтожная доля от всех мыслимых белковых молекул. Следовательно, все фантастическое разнообразие форм живой материи, в том числе и внутривидовое многообразие, основанное, как будет показано ниже, в первую очередь на многообразии белковых молекул, возникло в результате действия естественного отбора в пределах сравнительно небольшой и, скорее всего, достаточно случайной выборки из неисчерпаемого множества мыслимых белковых структур.

Приведенные в табл. 2.1 аминокислоты являются не просто главными компонентами белков, резко преобладающими в подавляющем большинстве белков. Именно из этих двадцати аминокислот образуются белки в живых организмах. Все остальные, достаточно разнообразные аминокислоты, которые, как правило, в незначительном количестве встречаются в тех или иных белках, образуются в результате химических превращений каких-либо из этих двадцати аминокислотных остатков уже в составе белковой молекулы.

Среди таких превращений в первую очередь следует отметить образование *дисульфидных мостиков* при окислении двух остатков цистеина в составе уже сформированных пептидных цепей. В результате из двух остатков цистеина образуется остаток диаминодикарбоновой кислоты *цистина* (4):



4

При этом возникает сшивка либо внутри одной полипептидной цепи, либо между двумя различными цепями. В качестве примера небольшого белка, имеющего две

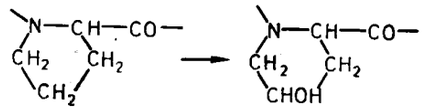
полипептидные цепи, скрепленные дисульфидными мостиками, а также сшивки внутри отдельных цепей, можно привести молекулу *инсулина* — гормона, вырабатываемого поджелудочной железой и ответственного за усвоение углеводов, в первую очередь глюкозы. Нарушения в синтезе инсулина вызывают тяжелое и, к сожалению, весьма распространенное заболевание — сахарный диабет, при развитых формах которого необходимо ежедневно вводить в организм этот гормон. Структура инсулина представлена на рис. 3.



Рис. 3. Схема строения молекулы инсулина человека в однобуквенной символике.

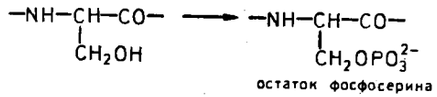
Скобкой обозначен внутрицепочечный дисульфидный мостик, а вертикальными линиями — межцепочечные дисульфидные мостики

Важным примером модификации аминокислотных остатков белков является превращение остатков пролина в остатки *гидроксипролина*:



Это превращение происходит, причем в значительном масштабе, при образовании важного белкового компонента соединительной ткани — *коллагена*. Первоначально в организме синтезируется проколлаген, богатый пролином полипептид, а затем в процессе созревания коллагена происходит окисление части остатков пролина до гидроксипролина.

Еще одним весьма распространенным видом модификации белков является фосфорилирование гидроксигрупп остатков серина, треонина и тирозина, например:



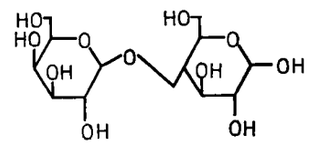
5

Функции белков чрезвычайно многообразны. При этом, как уже подчеркивалось, каждый данный белок как вещество с определенным химическим строением выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в отдельных случаях несколько, как правило, взаимосвязанных функций. Об одной из центральных функций, участии их в подавляющем большинстве химических превращений в качестве ферментов или важнейшего компонента ферментов речь уже шла в § 1.1. Ферменты в большинстве своем обеспечивают протекание необходимых для жизнедеятельности процессов при невысоких температурах и pH, близких к нейтральным. Кроме того, они обладают высокой, в некоторых случаях уникальной, избирательностью. Например, ферменты, катализирующие присоединение α-аминокислот к соответствующим транспортным РНК для последующего их участия в синтезе полипептидах на рибосомах (см. § 4.6), катализируют реакции L-аминокислот и не катализируют те же реакции D-аминокислот. Фермент, катализирующий присоединение к соответствующей тРНК валина, практически не катализирует присоединение к той же тРНК весьма сходного по структуре лейцина (см. табл. 2.1).

В ряде случаев белки сами по себе являются катализаторами. В качестве примера можно привести ферменты, выделяемые в желудочно-кишечном тракте, которые катализируют расщепление белков, являющихся компонентами пищи, до пептидов. Так, в желудочном соке содержатся фермент *пепсин*, разрушающий белки на крупные блоки, и ферменты *трипсин* и *химотрипсин*, вырабатываемые поджелудочной железой, которые катализируют деградацию этих блоков на более короткие фрагменты. В то же время окончательная деградация пептидов до аминокислот, которые, собственно, и усваиваются живым организмом, осуществляется ферментами *карбоксипептидазами*, которым для выполнения их каталитических функций помимо белковой части нужен ион Zn^{2+}. Это же имеет место в случае уже описанных в § 1.1 каталазы и цитохрома P450, у которых непосредственное участие в катализе принимает гем, а белковая часть фермента, называемая в этом случае *апоферментом*, лишь организует работу катализирующего процесс кофактора.

Учение о ферментах является центральной частью курса биохимии. Часто это учение рассматривают как самостоятельную дисциплину, называемую *Энзимологией*. Механизм действия ферментов рассмотрен в гл. 6, остальные многочисленные аспекты энзимологии пронизывают все содержание этого курса.

Вторая важная функция белков — транспорт веществ. У одноклеточных это в основном транспорт через мембрану. Внутрь клетки должны поступать многочисленные вещества, обеспечивающие ее строительным материалом и энергией. В то же время фосфолипидная мембрана непроницаема для таких важнейших компонентов, как аминокислоты, сахара, ионы щелочных металлов. Их проникновение внутрь клетки из окружающей среды происходит при участии специальных транспортных белков, вмонтированных в мембрану. Например, у многих бактерий имеется специальный белок, обеспечивающий перенос через наружную мембрану молочного сахара — *лактозы* (*6*). Последняя представляет собой дисахарид, образованный молекулами глюкозы и ее изомера галактозы:



6

и, как видно из приведенной формулы, является β-галактозидом. Белок, обеспечивающий перенос лактозы, способен переносить внутрь клетки и многие другие β-галактозиды, поэтому его называют *β-галактозидпермеазой*.

Транспорт через мембрану может происходить в некоторых специальных случаях и против градиента концентрации переносимых частиц. Важнейшим примером такого рода является перенос ионов натрия и калия. У многих клеток в

мембрану вмонтирована система, функционирующая как насос, выкачивающий из клетки ионы натрия и накачивающий в нее ионы калия. Естественно, что такой процесс требует расхода энергии и сопровождается гидролизом АТФ до АДФ и неорганического фосфата. Система представляет собой фермент, который катализирует гидролиз АТФ с одновременным переносом на каждую гидролизованную молекулу двух ионов K^+ внутрь клетки и трех ионов Na^+ наружу. Этот фермент называют *натрий-,калий-зависимой АТФазой* в соответствии с номенклатурой, принятой в биохимии для гидролитических ферментов.

В итоге внутренняя часть клетки оказывается заряженной отрицательно относительно окружающей среды. Помещая внутрь клетки микроэлектроды, можно замерить эту разность потенциалов, которая в случае нервных клеток может достигать нескольких десятков милливольт. Она получила название *потенциала покоя*. Наличие такого потенциала играет важную роль при передаче нервного импульса вдоль аксонов — длинных, достигающих в отдельных случаях (у особенно крупных животных) нескольких метров в длину отростков, соединяющих нервные клетки между собой и с исполнительными клетками, например клетками мышечной ткани. Нервный импульс представляет собой перемещающийся вдоль аксона *потенциал действия*, возникающий в результате локального повышения проницаемости участка аксона для ионов натрия. В результате повышения проницаемости ионы натрия устремляются внутрь клетки, нейтрализуя ее отрицательный заряд, что в итоге приводит к повышению потенциала до + 40÷50 мВ, после чего в течение порядка миллисекунды на этом участке аксона восстанавливается потенциал покоя. Потенциал действия может распространяться вдоль аксона со скоростью нескольких метров и даже десятков метров в секунду.

У многоклеточных организмов существует система транспорта веществ от одних органов к другим по кровеносной системе. В § 1.1 уже шла речь о входящем в состав эритроцитов гемоглобине, комплексе белка глобина с гемом, способном связывать O_2 и доставлять его в различные ткани и органы. Гемоглобин обратимо связывает молекулы O_2, который в данном случае выступает в качестве лиганда центрального иона Fe^{2+} гема. В легких, куда поступает свежий воздух и парциальное давление O_2 достаточно высоко, гемоглобин связывает O_2, а в тканях, интенсивно потребляющих его для различных окислительных процессов, где парциальное давление O_2 является низким, комплекс O_2 с гемоглобином, так называемый оксигемоглобин, диссоциирует, в результате чего O_2 поступает в ткань.

В качестве еще одного важного примера можно привести транспорт большого числа гидрофобных молекул в кровяном русле с помощью важнейшего компонента плазмы крови — *сывороточного альбумина*. Этот белок обладает уникальной способностью образовывать прочные комплексы с жирными кислотами, образующимися при переваривании жиров, с некоторыми гидрофобными аминокислотами, например с триптофаном, со стероидными гормонами, а также со многими лекарственными препаратами, такими, как аспирин, сульфаниламиды, некоторые пенициллины.

В кровеносной системе имеются и некоторые другие белки, обеспечивающие транспорт определенных компонентов по организму, например *трансферрин*, являющийся переносчиком ионов железа, и *церулоплазмин* — переносчик ионов меди.

Большое значение, в особенности для функционирования многоклеточных организмов, имеют разнообразные *белки-рецепторы*, вмонтированные в плазматическую мембрану клеток и служащие для восприятия и преобразования различных сигналов, поступающих от соседних клеток и от других органов по кровеносной системе и из окружающей среды. В качестве одного из наиболее детально исследованных примеров можно привести рецепторы ацетилхолина, находящиеся на поверхности воспринимающих клеток в ряде межнейронных контактов, в том числе контактов в коре головного мозга, и у нервно-мышечных соединений. Синапсы, в которых медиатором является ацетилхолин, называют холинэргическими. Воспринимающая клетка в таком синапсе содержит на поверхности многочисленные молекулы сложного, состоящего из нескольких полипептидных цепей белка — *рецептора ацетилхолина*. Этот белок специфично взаимодействует с ацетилхолином и отвечает на это взаимодействие передачей сигнала внутрь клетки, преобразуя его либо в потенциал действия, распространяющийся далее по воспринимающему нейрону, либо в сигнал, запускающий мышечное сокращение. После получения и преобразования сигнала нейромедиатор должен быть удален, чтобы клетка подготовилась к восприятию следующего сигнала. Поэтому в холинэргических синапсах функционирует специальный фермент — *ацетилхолинэстераза*, катализирующая гидролиз ацетилхолина до холина и ацетата. Кроме того, существуют системы активного, т.е. требующего затраты энергии, обратного транспорта ацетилхолина в нейрон для его повторного использования.

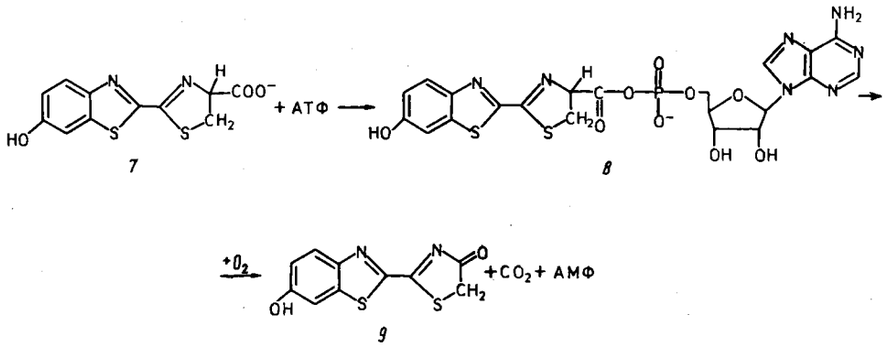
Многие гормоны не проникают внутрь клеток-мишеней, а связываются со специфическими рецепторами на поверхности этих клеток. Это связывание является сигналом, запускающим в клетке определенные физиологические процессы. Например, гормон адреналин, вырабатываемый надпочечниками, включает в клетке-мишени ключевую стадию окисления полисахаридов — превращение полимерного углевода гликогена в мономерное производное глюкозы, глюкозо-1-фосфат, который далее подвергается окислительной деструкции, сопровождающейся фосфорилированием большого числа молекул АДФ.

Важную роль в живой природе, особенно у многоклеточных организмов, играют различные процессы преобразования энергии. В этих процессах непосредственными участниками также являются белки. В сущности, один вид такого преобразования был только что рассмотрен — преобразование химической энергии, запасенной в ангидридных связях АТФ, в электрическую энергию натрий, калий-зависимой АТФазой. Гидролиз АТФ в этом случае приводит к возникновению разности электрических потенциалов между внутренним содержимым клетки и окружающей средой.

Широко распространено в природе превращение энергии гидролиза АТФ в механическую энергию, которое в наиболее совершенном виде происходит в мышцах. Здесь также основополагающим компонентом является специальный белок — миозин, который обладает способностью катализировать гидролиз АТФ до АДФ и неорганического фосфата, т.е. является АТФазой. В специально организованных надмолекулярных системах, содержащих помимо нитей миозина еще несколько белков, главным из которых является актин, гидролиз АТФ сопровождается сокращением мышечных волокон.

Более специальный случай — преобразование химической энергии окисления специальных органических соединений в световую энергию — наблюдается у некоторых бактерий и у светляков. В последнем случае свет генерируется в ходе

окисления *люциферинаденилата* (*8*) — продукта взаимодействия АТФ с люциферином (*7*):



Этот процесс катализируется специальным ферментом — *люциферазой.*

Перечисленными функциями роль белков в живой природе не исчерпывается. Некоторые из них будут изложены ниже в этом параграфе, другие будут рассмотрены в различных разделах курса. Однако уже из приведенных примеров видно, что функциональные белки обладают уникальной способностью с высокой степенью избирательности взаимодействовать с вполне определенными партнерами или, как принято говорить в биохимии, узнавать этих партнеров. Так, ферменты узнают совершенно определенные вещества — субстраты, превращение которых они катализируют; рецепторы узнают определенный гормон или нейромедиатор, транспортные белки — те компоненты, перенос которых через клеточную мембрану они должны обеспечить, и т.п.

Наиболее выпукло способность к узнаванию выражена у белков иммунной системы — уже упоминавшихся в § 1.4 иммуноглобулинов, или антител. Иммуноглобулины определенной специфичности начинают активно вырабатываться организмом в ответ на появление чужеродного антигена и обладают способностью избирательно связывать именно этот антиген. Если в роли антигена выступает большая молекула, например молекула белка, то антитело опознает не всю молекулу, а некоторый ее участок, называемый *антигенной детерминантой.* Белковые молекулы обычно имеют серию антигенных детерминант, и уже по этой причине в ответ на появление в организме чужеродного белка вырабатывается целый набор антител, направленных на разные детерминанты. Более того, к каждой детерминанте вырабатывается, как правило, несколько различных иммуноглобулинов. Поэтому даже иммуноглобулины, специфичные к одному определенному антигену, представляют собой не индивидуальные белки, а смесь большого числа сходным образом построенных молекул. А так как организм непрерывно встречается с разнообразными антигенами, то фракция иммуноглобулинов сыворотки крови представляет собой смесь огромного числа различных антител, причем содержание каждого из них, как правило, очень мало. Трудность выделения индивидуальных иммуноглобулинов долгое время была препятствием для их биохимического исследования, в том числе для установления их первичной структуры.

Тот факт, что иммуноглобулины взаимодействуют со сравнительно небольшой

узнающие некоторые небольшие молекулы, не встречающиеся в живой природе. Классическим примером является динитрофенильный остаток. При введении экспериментальным животным конъюгата динитрофенола с каким-либо белком, например бычьим сывороточным альбумином, начинается выработка антител, специфично узнающих различные производные динитрофенола. При этом сам нитрофенол или его низкомолекулярные производные при введении в организм иммунного ответа не вызывают. Такие вещества, способные служить антигенными детерминантами, но не способные (в первую очередь в силу небольшого размера) самостоятельно вызывать иммунный ответ, называют *гаптенами.*

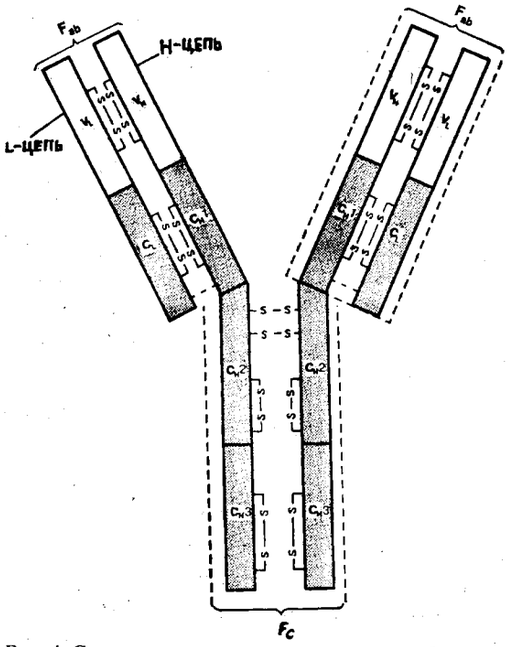


Рис. 4. Схема строения молекулы иммуноглобулина: H-цепь – тяжелая цепь; L-цепь - легкая цепь; V_H и V_L – вариабельные участки тяжелой и легкой цепей; C_H1, C_H2, C_H3, C_L – константные участки цепей; Fab – фрагмент иммуноглобулина, состоящий из L-цепи и половины H-цепи; F_C – концевая половина H-цепи; -S-S- – дисульфидный мостик

Согласно современным представлениям, каждый тип иммуноглобулина вырабатывается группой B-лимфоцитов, произошедших от одного предшественника. Такую группу лимфоцитов называют *клоном.* Клон возникает в результате того, что попавший в организм чужеродный антиген стимулирует дифференцировку и размножение предшественника B-лимфоцитов, настроенного на определенный антиген или, точнее, на определенную антигенную детерминанту.

Первые успехи в изучении строения иммуноглобулинов были связаны с изучением иммуноглобулинов, полученных от больных миеломой (см. § 1.4). Как уже говорилось, у таких больных в результате присутствия одного злокачественно разросшегося клона B-лимфоцитов вырабатывается огромное количество индивидуального иммуноглобулина, который сравнительно легко отделить от всех остальных. Дальнейшие успехи в получении индивидуальных антител связаны с достижениями клеточной биологии, позволившими осуществлять слияние клеток миеломы как носителей способности к неограниченному размножению с нормальными B-лимфоцитами как носителями программы для выработки антител определенной, задаваемой экспериментатором специфичности. Получающиеся клетки, *гибридомы* сохраняют способность к неограниченному размножению и вырабатывают индивидуальные антитела. Так как в этом случае гибридомы происходят от одной исходной слитной клетки, то они представляют собой единый клон; получающиеся из них антитела называют поэтому *моноклональными антителами.*

Антитела построены из четырех полипептидных цепей, связанных между

собой дисульфидными мостиками. Упрощенная схема строения молекулы иммуноглобулина класса G, наиболее распространенного среди иммуноглобулинов, представлена на рис. 4. Две полипептидные цепи имеют размер порядка 200 аминокислотных остатков и называются легкими цепями (L-цепи). Две другие вдвое больше по размеру и называются тяжелыми цепями (H-цепи). На N-конце у обеих цепей имеется так называемая *вариабельная область* размером немногим более 100 аминокислотных остатков, которая различна у иммуноглобулинов разной специфичности и даже у разных иммуноглобулинов, настроенных на определенную антигенную детерминанту. Именно вариабельные участки L- и H-цепей формируют центр, непосредственно взаимодействующий с узнаваемым антигеном или гаптеном. Остальная часть, составляющая у легкой цепи половину молекулы, а у тяжелой — три четверти, одинаковая в пределах иммуноглобулинов одного класса и не зависит от их специфичности. Эту область называют *константной* или C-областью.

Наряду с описанными выше белками, выполняющими тонкие высокоспециализированные функции, существуют белки, имеющие в основном структурное значение. Они обеспечивают те или иные аспекты механической прочности и других механических свойств отдельных тканей живых организмов. В первую очередь следует сказать об уже упоминавшемся выше коллагене — основном белковом компоненте внеклеточного матрикса соединительной ткани. У млекопитающих коллаген составляет до 25% от общей массы белков. Коллаген синтезируется в фибробластах — основных клетках соединительной ткани. Как уже отмечалось выше, первоначально он образуется в виде проколлагена, предшественника, который проходит в фибробластах определенную химическую обработку, состоящую, в частности, в окислении ряда остатков пролина до гидроксипролина и некоторых остатков лизина до δ-гидроксилизина. Коллаген формируется в виде трех скрученных в спираль полипептидных цепей, которые уже вне фибробластов объединяются в коллагеновые фибриллы диаметром в несколько сотен нанометров, а последние — в уже видимые в световом микроскопе коллагеновые нити.

В эластичных тканях — коже, стенках кровеносных сосудов, легких — помимо коллагена внеклеточный матрикс содержит белок *эластин*, способный в довольно широких пределах растягиваться и возвращаться в исходное состояние.

Еще один пример чисто структурного белка — это *фиброин* шелка, выделяемый гусеницами шелкопряда в период формирования куколки и являющийся основным компонентом шелковых нитей.

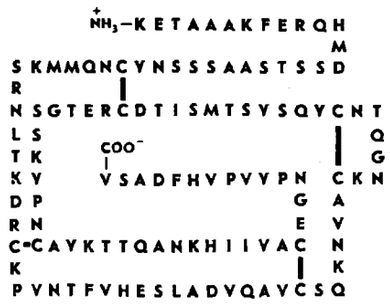


Рис. 5. Аминокислотная последовательность рибонуклеазы быка. Жирными линиями обозначены дисульфидные мостики

Следует еще раз подчеркнуть, что функционально различные белки какого-либо живого организма — это разные химические соединения, отличающиеся друг от друга в первую очередь последовательностью и числом аминокислотных остатков, формирующих одну или несколько полипептидных цепей, составляющих данный белок. Более того, белки, выполняющие одну и ту же функцию в разных живых организмах, могут отличаться по своей первичной структуре. В качестве примера можно привести *панкреатическую рибонуклеазу* (*РНКаза A*) — пищеварительный фермент, выделяемый поджелудочной железой (pancreas) и расщепляющий рибонуклеиновые кислоты до коротких фрагментов. Первичная структура этого фермента приведена на рис. 5. Табл. 2.2 иллюстрирует различия первичной структуры панкреатической РНКазы для нескольких видов млекопитающих. У этого короткого, порядка 125 аминокислотных остатков, белка различия между разными видами в пределах одного класса животных могут достигать десятков аминокислотных остатков. Различия на несколько аминокислотных остатков могут встречаться у индивидуумов, относящихся к одному и тому же виду. Например, в настоящее время у человека найдено несколько десятков разных вариантов молекул глобина — белковой части гемоглобина.

Таблица 2.2. **Аминокислотная последовательность панкреатической РНКазы некоторых млекопитающих** *

№ п/п	Животные	Аминокислотная последовательность
1	Бык	KETAAAKFERQHMDSSTSAASSSNYCNQMMKSRNLTKDRC
2	Антилопа гну	S S Q
3	Жираф	S I SV T Q
4	Свинья	SP K Q PDS SSN L R M QG
5	Лошадь	SP M GSTSSSNPT R M QGW
6	Крыса	GESR SS D K TEGPSK PT ROGM GS
7	Дикобраз	SS M G PS N E RR M Q
8	Морская свинка	A SS M Q PEG PSN V IR M QG
9	Человек	SR K Q DS PS T RR M QG
10	Ленивец	M Q GS LS Q K V M QFS
11	Кенгуру	P E Q TEH T L A DM SG
1		KPVNTFVHESLADVQAVCSQKNVACKNCQTNCYQSYSTMSITDCRETGSSKYPNCA
2		P
3		A N
4		I N N H Q
5		P I L IT S S S H L SG
6		P E I TЯ T RN HK S LR LK D
7		P R F N L H V D S
8		F L R R V S F S
9		P V N F EK T G K N S H L NG R
10		Q F E T Q H R N H Q SG L
11		L I PKS D H E T R K N R N Q A Q
1		YKTTQANKHIIVACEGNPYVPYHFDASV
2		A K
3		Q E Y
4		AS EQ P
5		Q S KER EVST
6		T DSQ I D
7		RMS LERS V S GPST
8		RMS Q S D EPSI

Продолжение табл. 2.2

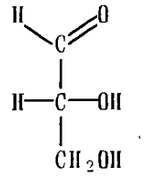
№ п/п	Животные	Аминокислотная последовательность
9	R SPKER S EDST
10	Q SNM R I EDST
11	E SNL Q Q Y

*Для 2—11 указаны только аминокислоты, отличающиеся от соответствующих аминокислот бычьей РНКазы.

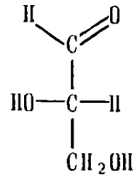
2.2. УГЛЕВОДЫ. МОНОСАХАРИДЫ И ПОЛИСАХАРИДЫ. ЗАПАСНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ. КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА

К углеводам относят моносахариды и образованные ими олигомеры и полимеры — соответственно олиго- и полисахариды. Сами моносахариды, их классификация, многочисленные виды изомерии систематически рассматриваются в курсах органической химии, и здесь приведены лишь краткие сведения, особенно существенные для изложения курса биохимии.

Моносахариды — это соединения, в основе которых лежит неразветвленная углеродная цепочка, при одном из атомов углерода которой находится карбонильная группа, а при всех остальных — по одной гидроксигруппе. В соответствии с этим все моносахариды имеют брутто-формулу $(CH_2O)_n$, т.е. как бы построены из углерода и воды, откуда и происходит название углеводы. Формально под определение моносахаридов подпадают формальдегид CH_2O и гликолевый альдегид CH_2OHCHO. Однако обычно моносахаридами называют соединения с длиной углеродной цепи не менее трех атомов С. В зависимости от числа атомов углерода моносахариды относят к *триозам* ($n = 3$), *тетрозам* ($n = 4$), *пентозам* ($n = 5$), *гексозам* ($n = 6$), *гептозам* ($n = 7$) и т.д. В зависимости от того, входит в состав моносахарида альдегидная или кетогруппа, их разделяют на *альдозы* и *кетозы*. У всех биологически наиболее значимых кетоз кетогруппа находится у второго от края углеродного атома (это положение, естественно, важно лишь начиная с $n = 5$). У всех альдоз и у всех кетоз начиная с $n = 4$ имеются один или несколько хиральных центров, т.е. существует несколько изомеров. Простейший моносахарид — глицериновый альдегид — представлен двумя энантиомерами D-изомером (10) и L-изомером (11). У альдоз начиная с $n = 4$ и кетоз начиная с $n = 5$ существует несколько диастереомеров, представляющих собой разные по химическим свойствам соединения, причем каждый из диастереомеров может существовать в L- или D-конфигурации. При этом под D-конфигурацией понимают ту, у которой расположение заместителей при предпоследнем атоме С совпадает с их расположением у *D-глицеринового альдегида*:



10



11

Полный перечень всех альдоз вплоть до гексоз с указанием конфигурации при каждом из хиральных центров приведен в табл. 2.3.

Таблица 2.3. Конфигурации хиральных центров альдоз с $n = 3 \div 6$

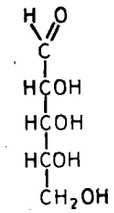
Альдоза	D-Изомер	L-Изомер	Альдоза	D-Изомер	L-Изомер
Триозы			**Гексозы**		
Глицериновый альдегид	D	L	Талоза	LLLD	DDDL
			Галактоза	DLLD	LDDL
Тетрозы			Идоза	LDLD	DLDL
Треоза	LD	DL	Гулоза	DDLD	LLDL
Эритроза	DD	LL	Манноза	LLDD	DDLL
Пентозы			Глюкоза	DLDD	LDLL
Ликсоза	LLD	DDL	Альтроза	LDDD	DLLL
Ксилоза	DLD	LDL	Аллоза	DDDD	LLLL
Арабиноза	LDD	DLL			
Рибоза	DDD	LLL			

Примечание. Отнесение к D- или L-конфигурации делается на той же основе, как и для предпоследнего атома С, по взаимному расположению в пространстве заместителей H, OH, радикала, содержащего альдегидную группу, и остальной части остова.

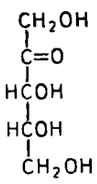
Все моносахариды в живых организмах встречаются преимущественно в виде различных производных, прежде всего в виде фосфатов, а пентозы — в виде нуклеотидов.

Гексозы и в отдельных случаях пентозы в качестве мономерных звеньев входят в многочисленные полисахариды.

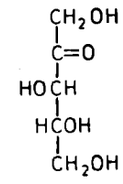
Среди изомеров пентоз в курсе чаще всего будут упоминаться производные D-*рибозы* (12) и двух кетоз — D-*рибулозы* (13) и D-*ксилулозы* (14):



12

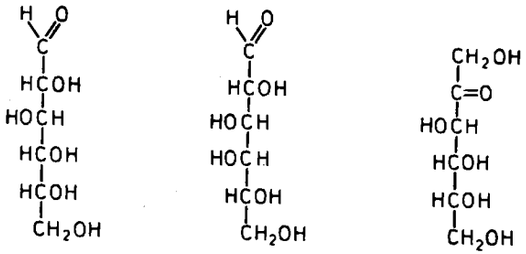


13



14

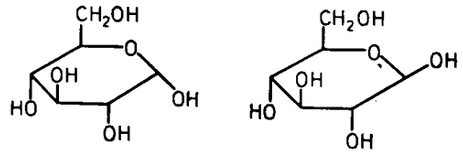
а среди гексоз — производные D-*глюкозы* (15), D-*галактозы* (16) и D-*фруктозы* (17):



15 16 17

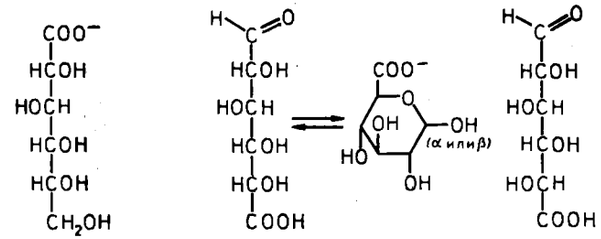
Карбонильные группы моносахаридов с длиной цепи $n = 5$ и более могут образовывать с соответствующими гидроксигруппами циклические полуацетали или полукетали, которые находятся в равновесии с линейными формами. При этом могут возникать либо пятичленные циклы, содержащие кольцо фурана, либо шестичленные, содержащие кольцо пирана.

Такие формы моносахаридов называют соответственно *фуранозными* и *пиранозными* формами. При этом атом углерода, принадлежащий в открытой форме карбонильной группе, становится хиральным центром, т.е. появляется дополнительная возможность изомерии. Изомеры, отличающиеся расположением гидроксигруппы при полуацетальном атоме углерода относительно плоскости кольца*, называют *аномерами*: у α-аномера эта гидроксигруппа и CH_2OH-группа находятся по разные стороны плоскости, у β-аномера они находятся по одну сторону плоскости кольца. В качестве иллюстрации ниже приведены α- и β-аномеры глюкозы:



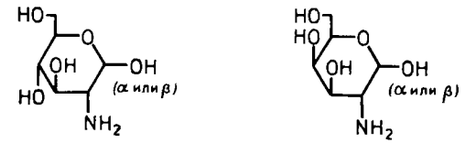
Рассмотренные в § 2.3 нуклеотиды являются производными β-аномера рибозы.

Наряду с собственно моносахаридами в живых организмах широко представлены продукты их окисления и восстановления. Продукты восстановления одной из гидроксигрупп моносахарида называют *дезоксисахарами*. Примером их является дезоксирибоза, лежащая в основе структуры дезоксирибонуклеотидов и ДНК. Окисление альдегидной группы до карбоксильной приводит к соответствующим *альдоновым кислотам*, а окисление концевой спиртовой группы до карбоксильной — к *уроновым кислотам*. В качестве примеров можно привести *глюконовую* (18), *глюкуроновую* (19) и L-*идуроновую* (20) кислоты (последняя — производное L-идозы, см. табл. 2.3). Первая в виде фосфата является промежуточным продуктом окислительной деструкции глюкозы, две последние входят в состав некоторых полисахаридов:



18 19 20

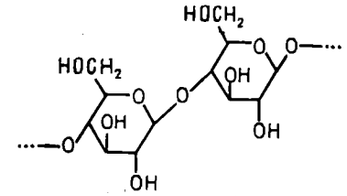
В состав ряда полисахаридов входят также производные D-глюкозы и D-галактозы, у которых при атоме C2 гидроксигруппа заменена на аминогруппу — соответственно D-*глюкозамин* (21) и D-*галактозамин* (22):



21 22

Моносахариды, в первую очередь различные гексозы и их производные, образуют большое число различных олиго- и полисахаридов путем конденсации полуацетальной гидроксигруппы при атоме C1 с одной из гидроксигрупп соседнего мономерного звена (C2, C3, C4 или C6). Образующуюся связь между мономерами называют O-*гликозидной*.

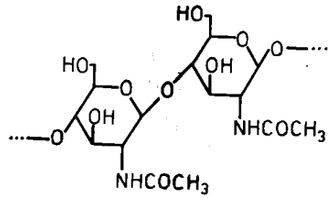
Полисахариды выполняют ряд важных структурных функций в живой природе. Самый распространенный полисахарид — это *целлюлоза*, которая, по имеющимся оценкам, производится в природе в количестве 10^{11} т в год. Целлюлоза — линейный полимер, построенный из β-D-глюкозы, причем соседние звенья соединены кислородным мостиком между атомами C1 и C4:



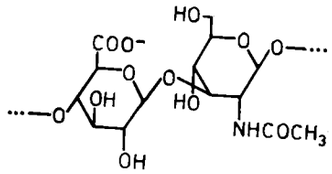
Целлюлоза является важнейшим компонентом клеточных стенок растений и в сочетании с другими соединениями обеспечивает уникальную механическую прочность этих стенок, что делает возможным существование растений огромного размера — деревьев. Второй повсеместно распространенный в живой природе

*За «плоскость кольца» принимают среднюю плоскость цикла, который сам по себе, вследствие алифатического характера, не является плоским и подвержен ряду конформационных изменений.

полисахарид — *хитин*, образующий наружный скелет у членистоногих, — построен аналогичным образом из звеньев β-аномера D-N-ацетилглюкозамина:



Группа полисахаридов входит в состав основного вещества межклеточного пространства соединительной ткани, в которое погружены коллагеновые волокна. Главным среди них является *гиалуроновая кислота*, построенная из чередующихся остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Кислородные мостики образованы между атомами C1 глюкуроновой кислоты и C3 N-ацетилглюкозамина и между атомами C1 N-ацетилглюкозамина и C4 глюкуроновой кислоты:



Гиалуроновая кислота является также важным компонентом синовиальной жидкости — вязкой среды, заполняющей области сочленения костей.

Для записи структуры олиго- и полисахаридов, в особенности с чередующимися и нерегулярными последовательностями, так же как и в случае белков, используется трехбуквенная символика. Обозначения, принятые для важнейших моносахаридов и их производных, приведены в табл. 2.4.

Таблица 2.4. **Символика используемых для записи важнейших моносахаридов и их производных**

Название моносахаридов и их производных	Трехбуквенная символика	Название моносахаридов и их производных	Трехбуквенная символика
Глюкоза	Glc	Рибулоза	Rbu
Галактоза	Gal	Ксилулоза	Xlu
Манноза	Man	N-ацетилглюкозамин	GlcNAc
Идоза	Ido	N-ацетилгалактозамин	GalNAc
Фруктоза	Fru	Глюкуроновая кислота	GlcUA
Рибоза	Rib	Идуроновая кислота	IdoUA
Ксилоза	Xyl		

При записи структуры олиго- или полимера указывают также перед символом моносахарида конфигурацию при аномерном центре, а после символа — между

каким атомом моносахарида и атомом записанного справа соседнего мономера образована связь. В этой символике запись приведенных выше полисахаридов — целлюлозы, хитина и гиалуроновой кислоты — имеет вид

$$[-\beta\text{Glc}(1 \longrightarrow 4)-]_n \; [-\beta\text{GlcNAc}(1 \longrightarrow 4)-]_n$$

$$[-\beta\text{GlcUA}(1 \longrightarrow 3)\beta\text{GlcNAc}(1 \longrightarrow 4)-]_n$$

В состав основного вещества соединительной ткани входят также полисахариды, содержащие остатки серной кислоты, этерифицированные свободными гидроксигруппами мономерных звеньев. Главными из них являются *хондроитинсульфат*, тетрасахаридный фрагмент которого в сокращенной символике можно записать в виде

$$-\beta\text{GalNAc}(4-SO_3^-)(1 \rightarrow 4)\beta\text{GlcUA}(1 \rightarrow 3)\;\beta\text{GalNAc}(6-SO_3^-)(1 \rightarrow 4)\beta\text{GlcUA}(1 \rightarrow 3)-$$

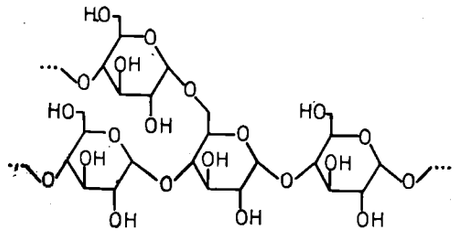
и *дерматансульфат*, дисахаридная структурная единица которого, содержащая фрагмент L-идуроновой кислоты, имеет вид

$$-\alpha\text{-L-IdoUA}(1 \longrightarrow 3)\beta\text{GalNAc}(4-SO_3^-)-$$

Перечисленные полисахариды, имеющие в своем составе анионные группы, объединяют общим названием *мукополисахариды*.

К числу мукополисахаридов относится и важный компонент крови — *гепарин*, который препятствует ее самопроизвольному свертыванию (коагуляции). Структура гепарина, по-видимому, гетерогенна. Он построен из остатков D-глюкуроновой и L-идуроновой кислот и остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных между собой $\alpha(1 \longrightarrow 4)$-мостиками, причем часть аминогрупп глюкозамина, 6-гидроксигрупп глюкозамина и 2-гидроксигрупп идуроновой кислоты несут остатки $-SO_3^-$.

Вторая важная функция полисахаридов — создание запасов глюкозы в устойчивой и в то же время легко мобилизуемой форме, позволяющей использовать ее по мере необходимости для биоэнергетических целей и для создания ряда промежуточных соединений биосинтеза многочисленных компонентов клетки, включая аминокислоты и нуклеотиды. У животных функцию запасного полисахарида выполняет *гликоген*. Его молекулы имеют разветвленную структуру, остовом которой является линейная цепь, построенная из фрагментов α-D-глюкозы, связанных кислородными мостиками между атомами C1 и C4. В отдельных звеньях этой цепи по C6-атому присоединены своими C1-концами такие же цепочки, которые также могут иметь точки разветвления. Узловой фрагмент гликогена в каждой точке ветвления имеет структуру



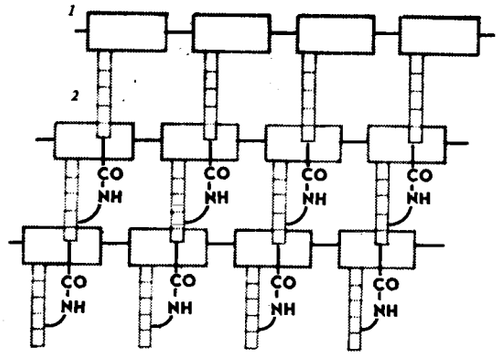
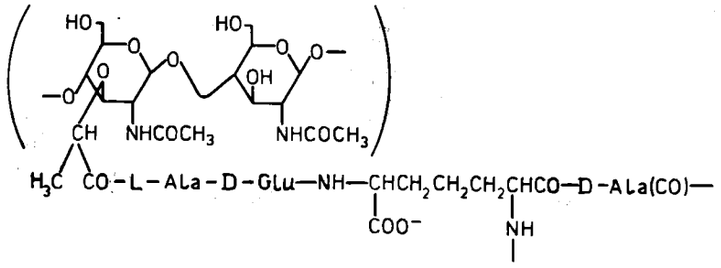


Рис. 6. Схема строения пептидогликана бактериальной клетки *Escherichia coli*.

Жесткий каркас образован полисахаридными цепями (*1*), связанными короткими пентапептидными фрагментами (*2*)

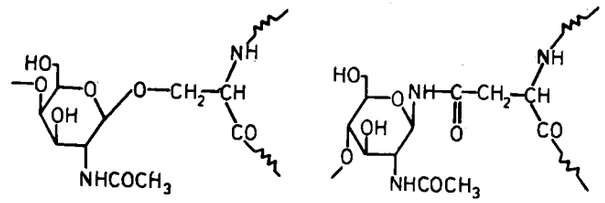
У растений аналогичную функцию выполняет ***крахмал***, который состоит из линейного полимера глюкозы с (1⟶4)-связями — *амилозы* — и аналогичного по структуре гликогену разветвленного полисахарида *амилопектина*.

Углеводы встречаются в живых организмах и в составе более сложных структур. Так, клеточные стенки бактерий построены из *пептидогликанов*, являющихся производными линейных полисахаридов, несущих ковалентно связанные с ними пептидные фрагменты. Эти фрагменты осуществляют сшивание полисахаридных цепей с образованием механически прочной сетчатой структуры. Например, клеточная стенка *E.coli* построена из полисахаридных цепей, образованных остатками N-ацетилглюкозамина, связанными β-(1 ⟶ 4)-связями, причем каждый второй остаток несет присоединенный по атому C3 фрагмент, образованный связанными амидными связями остатками молочной кислоты, L-аланина, D-глутамата (через γ-карбоксил), мезодиаминопимелината и D-аланина:



Каждая C-концевая группа этого пептида, принадлежащая остатку D-аланина, образует амидную связь с аминогруппой остатка диаминопимелиновой кислоты, принадлежащей соседней полисахаридной цепи. В итоге образуется сетчатая структура, изображенная схематично на рис. 6.

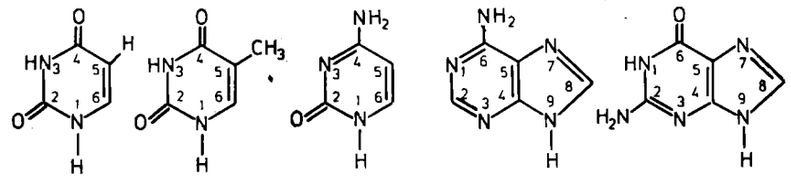
У эукариот многие белки несут на себе олигосахаридные фрагменты, т.е. являются *гликопротеинами*. Концевой остаток этих фрагментов обычно представлен N-ацетилгалактозамином или N-ацетилглюкозамином и связан либо O-гликозидной связью с остатком серина или треонина, либо N-гликозидной связью с амидной группой остатка аспарагина белкового остова. Участок гликопротеина, непосредственно примыкающий к участку соединения белка и олигосахарида, имеет строение



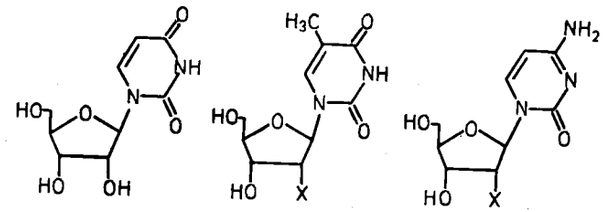
2.3. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ — НОСИТЕЛИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ

Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры, построенные из нуклеотидов — сложных органических молекул, состоящих из остатка пентозы — рибозы или дезоксирибозы, этерифицированного по одной из гидроксигрупп остатком фосфорной кислоты и связанного N-гликозидной связью с азотсодержащим гетероциклом. Рибоза и дезоксирибоза входят в состав нуклеотидов в фуранозной форме, причем природные, входящие в состав нуклеиновых кислот нуклеотиды всегда являются D-изомерами и β-аномерами. В зависимости от того, какой углевод входит в состав нуклеотида, различают *рибонуклеотиды* и *дезоксирибонуклеотиды*. Соответственно нуклеиновые кислоты разделяются на две большие группы — построенные из рибонуклеотидов *рибонуклеиновые кислоты* (РНК) и построенные из дезоксирибонуклеотидов *дезоксирибонуклеиновые кислоты* (ДНК).

Ниже приведены пять главных гетероциклов, входящих в состав нуклеиновых кислот, и нумерация атомов, принятая для этих гетероциклов:



При этом аденин, гуанин и цитозин входят в состав как ДНК, так и РНК, в то время как тимин за редкими исключениями входит только в ДНК, а урацил — только в РНК. Урацил, тимин и цитозин являются производными 2-гидроксипиримидина или, точнее, его таутомерной формы — 1,2-дигидро-2-оксопиримидина, соответствующие нуклеотиды поэтому называют *пиримидиновыми нуклеотидами*. Аденин и гуанин являются производными пурина; содержащие их нуклеотиды соответственно называют *пуриновыми нуклеотидами*. Продукты рибозилирования или дезоксирибозилирования этих гетероциклов называют *нуклеозидами*:



Уридин

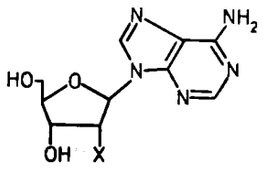
28

X=OH – риботимидин
X=H – тимидин

29

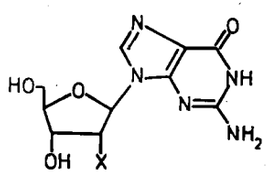
X=OH – цитидин
X=H – дезоксицитидин

30



X=OH – аденозин
X=H – дезоксиаденозин

31



X=OH – гуанозин
X=H – дезоксигуанозин

32

Нумерация атомов в углеводном фрагменте сохраняется та же, что и у свободных углеводов, т.е. ведется от гликозидного центра, но, чтобы отличить их от номеров атомов гетероцикла, они снабжены штрихами. Атом углерода, связанный с гетероциклом, является 1′-атомом, гидроксигруппы у рибонуклеотидов находятся в 2′, 3′ и 5′-положении, дезоксирибонуклеозиды, являющиеся компонентами ДНК, являются, строго говоря, 2′-дезоксинуклеозидами и содержат гидроксигруппы в 3′- и 5′-положении.

Остаток фосфорной кислоты в нуклеотидах может находиться в 3′, 5′, а у рибонуклеотидов еще и в 2′-положении. Названия нуклеотидов чаще всего производят от названий соответствующих нуклеозидов с указанием места присоединения ортофосфата к остатку рибозы или дезоксирибозы (например, аденозин-5′-монофосфорная кислота или аденозин-5′-монофосфат). Наряду с этим используют несколько укороченные или сокращенные названия. Все они для главных нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, приведены в табл. 2.5.

Таблица 2.5. Главные нуклеотиды. Сокращенные и укороченные названия

Название нуклеотида *	Укороченное название нуклеотида	Сокращенное название	
		русское	латинское
Аденозин-5′-монофосфат	Аденилат	АМФ	AMP
Аденозин-5′-дифосфат	–	АДФ	ADP
Аденозин-5′-трифосфат	–	АТФ	ATP

Продолжение табл. 2.5

Название нуклеотида *	Укороченное название нуклеотида	Сокращенное название	
		русское	латинское
Гуанозин-5′-монофосфат	Гуанилат	ГМФ	GMP
Гуанозин-5′-дифосфат	–	ГДФ	GDP
Гуанозин-5′-трифосфат	–	ГТФ	GTP
Уридин-5′-монофосфат	Уридилат	УМФ	UMP
Уридин-5′-дифосфат	–	УДФ	UDP
Уридин-5′-трифосфат	–	УТФ	UTP
Тимидин-5′-монофосфат	Тимидилат	дТМФ	dTMP
Тимидин-5′-дифосфат	–	дТДФ	dTDP
Тимидин-5′-трифосфат	–	дТТФ	dTTP
Цитидин-5′-монофосфат	Цитидилат	ЦМФ	CMP
Цитидин-5′-дифосфат	–	ЦДФ	CDP
Цитидин-5′-трифосфат	–	ЦТФ	CTP

*Для нуклеотидов дезоксиряда, содержащих в качестве гетероцикла аденин, гуанин и цитозин, используются те же названия, но с приставкой *дезокси-*, например дезоксиаденозин-5′-дифосфат, он же дезоксиаденилат, сокращенно дАДФ или dADP.

Для тимидилата приставку *дезокси-* в полном и укороченном названиях обычно опускают, поскольку для него характерна именно дезоксиформа.

Если принять во внимание способ образования нуклеиновых кислот при биосинтезе (т.е. синтезе в живых организмах или с помощью ферментных систем, выделенных из живых организмов), то их следует рассматривать как полимеры, образованные нуклеозид-5′-фосфатами. При этом каждый остаток фосфорной кислоты мономера, кроме концевого, связан фосфоэфирной связью с 3′-ОН-группой соседнего мономерного звена. На рис. 7 приведена структура примыкающих к концам фрагментов нуклеиновой кислоты с некоторой произвольной последовательностью нуклеотидов. Видно, что все остатки фосфорной кислоты, кроме одного, образуют фосфодиэфирные группы и все 3′-гидроксигруппы, кроме одной, участвуют в образовании фосфоэфирных связей. Остаток, содержащий 5′-фосфомоноэфирную группу, называют 5′-концевым, а остаток, содержащий неэтерифицированную 3′-гидроксигруппу, — 3′-концевым.

У рибонуклеиновой кислоты все мономерные звенья содержат свободную 2′-гидроксигруппу, а на 3′-конце в представленном на рис. 7 варианте имеется *цис*-диольная группа. Следует, однако, иметь в виду, что при различных биохимических манипуляциях с нуклеиновыми кислотами, а также при их гидролитическом расщеплении в составе живых организмов могут возникать полинуклеотидные фрагменты, имеющие на 5′-конце нефосфорилированную свободную 5′-гидроксигруппу, и фрагменты, содержащие связанный с 3′-концевой гидроксигруппой

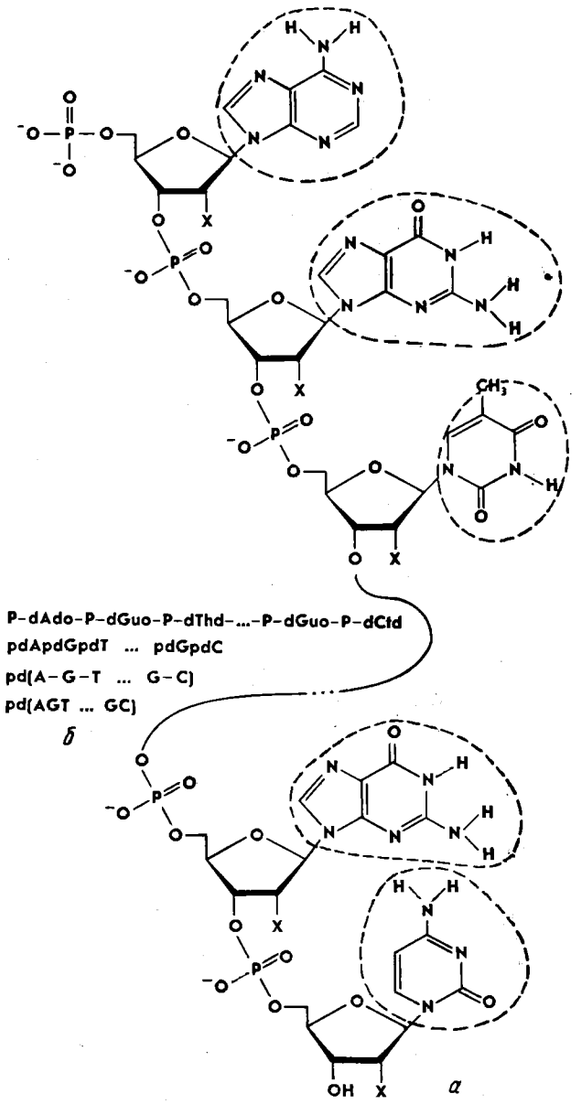


Рис. 7. Фрагмент нуклеиновой кислоты (X = H для ДНК, X = OH для РНК) в виде структурной формулы (*а*) и записанный различной символикой (для случая ДНК) (*б*)

фосфат. Кроме того, в природе нередко встречаются кольцевые молекулы ДНК. Кольцевая структура образуется из представленной на рис. 7 линейной структуры, если соединить 5′-концевой фосфат и 3′-концевую OH-группу одной цепи между собой фосфоэфирной связью.

Как и в случае белков, для записи структуры нуклеиновой кислоты или ее

Таблица 2.6. Символика, используемая для записи гетероциклов, рибо- и дезоксирибонуклеозидов

Гетероцикл (название)	Трехбуквенный символ	Нуклеозид (название)	Трехбуквенный символ	Однобуквенный символ
Урацил	Ura	Уридин	Urd	U
Тимин	Thy	Тимидин	dThd	dT
		Риботимилин	Thd	T
Цитозин	Cyt	Цитидин	Cyd	C
		Дезоксицитидин	dCyd	dC
Аденин	Ade	Аденозин	Ado	A
		Дезоксиаденозин	dAdo	dA
Гуанин	Gua	Гуанозин	Guo	G
		Дезоксигуанозин	dGuo	dG

фрагмента широко используют сокращенную символику. В некоторых случаях такая символика используется для гетероциклов, что упрощает вид структурных формул нуклеозидов и нуклеотидов. Применяемая трехбуквенная символика для нуклеозидов и гетероциклов и однобуквенная символика для нуклеозидов приведены в табл. 2.6.

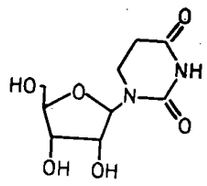
При использовании трехбуквенной символики остатки фосфорной кислоты обозначают прописной буквой P, а при использовании однобуквенной символики — строчной буквой p. Часто последнюю заменяют чертой, а при записи особенно длинных последовательностей вообще опускают. Символ d, указывающий, что речь идет о дезоксирибонуклеозиде или дезоксирибонуклеотиде, можно ставить перед каждым символом нуклеозида, а можно и перед всей последовательностью.

Все используемые варианты записей для иллюстрации приведены на рис. 7 применительно к изображенному на нем фрагменту молекулы нуклеиновой кислоты. При использовании сокращенной символики принято указывать, с какой стороны находятся 5′- и 3′-концы цепи. Если же это не указано, то подразумевается, что 5′-гидроксил находится слева, а 3′-гидроксил — справа от символа нуклеозида.

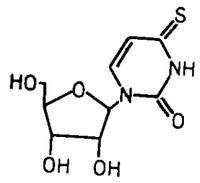
Хотя нуклеиновые кислоты содержат всего четыре типа мономерных звеньев, множество мыслимых нуклеотидных последовательностей превосходит таковое для белков вследствие существенно большей длины полинуклеотидных цепей. Так, сравнительно небольшая ДНК митохондрий представляет собой две полинуклеотидные цепи, каждая из которых содержит до нескольких десятков тысяч связанных между собой нуклеотидов. В хромосоме *E.coli* число нуклеотидов в каждой из двух полинуклеотидных цепей составляет около четырех миллионов.

Как и в белках, наряду с главными компонентами, из которых, собственно, и строится каждая новая молекула нуклеиновой кислоты, в ряде случаев в нуклеиновых кислотах можно найти редко встречающиеся *минорные нуклеотиды*.

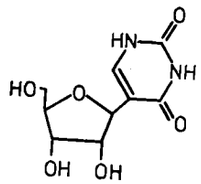
Разнообразие их особенно велико у транспортных рибонуклеиновых кислот. Минорные нуклеотиды образуются в организме в результате химических превращений (модификаций) нуклеотидных остатков, происходящих уже после формирования полинуклеотидной цепи. Например, остатки уридина в определенных участках предшественника РНК могут претерпевать гидрирование, приводящее к образованию остатка *дигидроуридина* (33), сульфгидрирование с образованием остатка *4-тиоуридина* (34), изомеризацию, приводящую к остатку *псевдоуридина* (35):



33

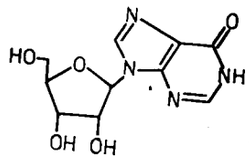


34



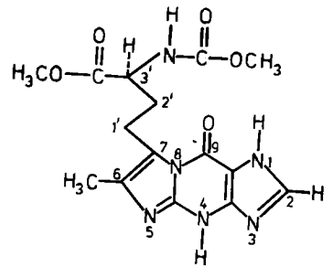
35

Остатки аденозина могут дезаминироваться, превращаясь в остаток *инозина* — нуклеозида, содержащего в качестве гетероцикла *гипоксантин*:



36

В некоторых случаях остатки нуклеозидов в составе тРНК претерпевают особенно глубокие превращения, образуя гипермодифицированные нуклеозиды. В качестве примера можно привести *вайбутозин* (37), встречающийся у эукариотических тРНК, присоединяющих фенилаланин. Он образуется путем многоступенчатых превращений из остатка гуанозина и имеет следующее строение:



37

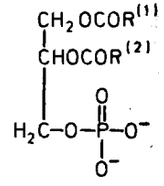
Чрезвычайно распространены как в РНК, так и в ДНК различные метилированные производные, причем у РНК объектом метилирования могут быть и 2′-гидроксигруппы остатков рибозы. Например, в состав специфичной к фенилаланину тРНК из дрожжей входят 5-метилуридин (риботимидин), 5-метилцитидин, 2′-О-метилцитидин, 1-N-метиладенозин, 2-N-метилгуанозин, 2,2-N-диметилгуанозин, 7-метилгуанозин и 2′-О-метилгуанозин (см. рис. 28).

2.4. КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ. ЛИПИДЫ

Клеточная мембрана — неотъемлемый элемент любой клетки. Ее роль в первую очередь состоит в том, чтобы отгородить содержимое клетки от окружающей среды, сосредоточить в небольшом объеме пространства все необходимые информационные и функциональные структуры, а у клеток эукариот, кроме того, разделить внутреннюю часть клетки на различные функционально автономные отсеки — ядро, митохондрии и ряд других. Во внешней плазматической мембране клетки функционируют транспортные белки, рецепторы и связанные с ними белковые системы преобразования полученных сигналов. Но структурную основу мембран составляют липиды.

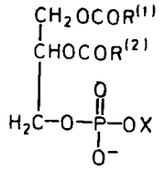
Термин *липиды* объединяет ряд структурно и функционально различных соединений, отличающихся своей гидрофобностью или, по крайней мере, наличием в составе их молекул больших гидрофобных фрагментов. Структура мембраны в первую очередь обеспечивается *фосфолипидами*, которые в основном представлены двумя группами соединений — фосфодиацилглицеринами и сфингомиелинами.

Фосфодиацилглицерины — наиболее распространенные представители фосфолипидов, они повсеместно присутствуют у всех живых организмов. Они являются производными *фосфатидных* кислот (38) — диацильных производных глицерин-1-фосфата



38

где $R^{(1)}$ и $R^{(2)}$ — радикалы жирных кислот. Основные представители жирных кислот, встречающихся в составе фосфодиацилглицеринов, приведены в табл. 2.7. Это в основном кислоты с длиной углеродной цепи 12—24 атома, либо полностью насыщенные, либо имеющие одну или несколько несопряженных двойных связей. Уже в структуре фосфатидных кислот заложена основная черта фосфолипидов — сочетание больших гидрофобных фрагментов и гидрофильной «головки», в данном случае остатка фосфорной кислоты, которая при нейтральном pH несет около полутора единиц отрицательного заряда. Три наиболее распространенных фосфолипида, имеющих в основе своей структуры фосфатидную кислоту, — это *фосфатидилэтаноламин*, *фосфатидилхолин* и *фосфатидилсерин* (39 а, б, в)



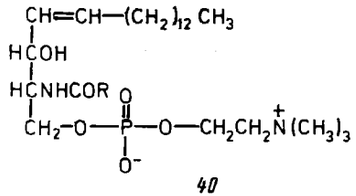
а) X = $-CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$ – фосфатидилэтаноламин

б) X = $-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ – фосфатидилхолин (лецитин)

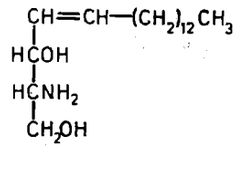
в) X = $-CH_2\underset{COO^-}{\underset{|}{CH}}\overset{+}{N}H_3$ – фосфатидилсерин

39а,б,в

Сфингомиелины (40) являются производными аминоспирта сфингозина (41)



40



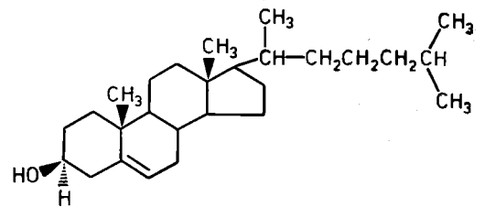
41

и содержат помимо большого гидрофобного радикала в составе самого сфингозина остаток жирной кислоты, связанный амидной связью с аминогруппой, и остаток фосфохолина, этерифицированного первичным гидроксилом аминоспирта. Сфингомиелины характерны для животных клеток — в мембранах бактерий и растений они отсутствуют.

Таблица 2.7. **Важнейшие природные жирные кислоты**

Число атомов С	Название	Строение
12	Лауриновая	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
14	Миристиновая	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
16	Пальмитиновая	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
18	Стеариновая	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
20	Арахиновая	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
24	Лигноцериновая	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
16	Пальмитоолеиновая	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH{-}(CH_2)_7COOH$
18	Олеиновая	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH{-}(CH_2)_7COOH$
18	Линолевая	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}(CH_2)_7COOH$
18	Линоленовая	$CH_3CH_2(CH{=}CH{-}CH_2)_3(CH_2)_6COOH$
20	Арахидоновая	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CH{-}CH_2)_4CH_2CH_2COOH$

Еще один важный компонент животных мембран — *холестерин* (42). Он относится к классу соединений, называемых *стероидами*, имеющими в своей основе структуру пергидроциклопентанофенантрена:



42

В табл. 2.8 приведены данные о содержании перечисленных выше компонентов в некоторых типичных плазматических мембранах животных и *E.coli*. Известно большое число других липидных компонентов, которые, как правило, характерны для более специализированных мембран.

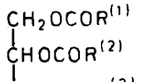
Таблица 2.8. **Содержание некоторых липидов в мембранах (в % от общего содержания липидов)**

Липид	Эритроциты	Печень крысы	*E.coli*
Лецитин	31	18	–
Фосфатидилэтаноламин	15	11	80
Фосфатидилсерин	7	9	–
Сфингомиелин	8,5	14	–
Холестерин	24	30	–

Общей чертой всех приведенных фосфолипидов является наличие в составе одной молекулы одновременно больших алифатических радикалов, стремящихся избежать контакта с водой, и гидрофильной заряженной или цвиттерионной группой. В результате в водных растворах такие молекулы образуют двойной слой с обращенными в водную фазу гидрофильными фрагментами и обращенными друг к другу объемистыми гидрофобными радикалами. Они имеют тенденцию к самопроизвольному сворачиванию в сферические микрочастицы, так называемые *липосомы*. Внутренняя область мембраны, находящаяся между двумя гидрофильными слоями, представляет собой гидрофобную микрофазу, способную растворять неполярные молекулы, например молекулы холестерина. Именно такие двойные фосфолипидные слои образуют структурную основу клеточной мембраны, однако в нее, как в некий подвижный каркас, вмонтированы разнообразные мембранные белки.

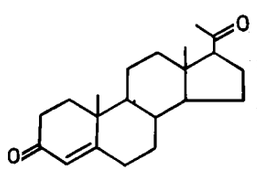
Ни многообразие структур, ни многообразие функций липидов перечисленным выше не исчерпываются. Большую роль в качестве гидрофобных покрытий листьев и плодов у растений, кожных покровов у животных имеют *воска* — этерифицированные жирными спиртами жирные кислоты. Например, главный компонент пчелиного воска — эфир пальмитиновой кислоты и спирта $C_{30}H_{61}OH$:

Триглицериды жирных кислот — *жиры* (43) — являются важным депо топлива, мобилизуемого в необходимых ситуациях для производства энергии, и важным компонентом пищевого рациона:

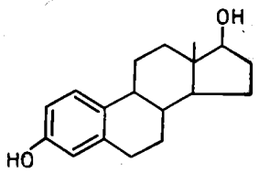


43

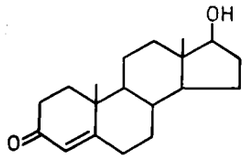
Холестерин является предшественником ряда гормонов, относящихся к группе стероидных гормонов, в том числе женских половых гормонов *прогестерона* (44) и *эстрадиола* (45) и мужского полового гормона *тестостерона* (46):



44



45



46

Эти гормоны вырабатываются соответственно в яичниках, в семенниках, а во время беременности и в плаценте и выполняют ряд функций, связанных с процессом размножения и в формировании вторичных половых признаков. Так, прогестерон необходим для нормального развития беременности, а тестостерон ответствен за рост волосяного покрова на лице.

Арахидоновая кислота является предшественником группы важных биологических регуляторов — *простагландинов*.

2.5. ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

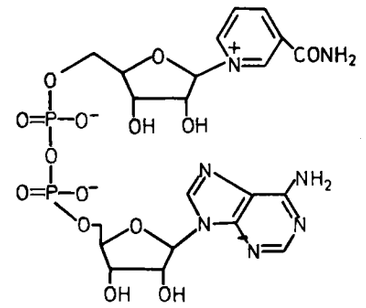
В живых организмах представлены многие тысячи различных органических соединений. Часть из них универсальна для всей живой природы, другие встречаются лишь у некоторых систематических групп животных, растений или микроорганизмов, некоторые уникальны, т.е. характерны для отдельных представителей живого мира или небольшого числа представителей.

Несколько важнейших групп этих соединений уже рассмотрены в предыдущих параграфах: аминокислоты, из которых строятся все белки, нуклеотиды, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты, различные моно- и олигосахариды, липиды. При этом каждое из описанных в § 2.1—2.4 соединений в растениях, у подавляющего большинства микроорганизмов, а в значительном числе случаев и у животных должно синтезироваться из простых предшественников. Как правило, такие синтезы проходят в несколько стадий и, следовательно, в живых организмах соединения этих биосинтетических процессов. Систематическое изложение путей биосинтеза аминокислот, нуклеотидов, сахаров и липидов вместе с описанием промежуточных соединений дается в гл. 9.

Все низкомолекулярные компоненты клеток должны в определенных условиях подвергаться деградации. Иногда деградация должна обеспечить удаление скопившихся излишков тех или иных соединений. В ряде важных случаев такая деградация является поставщиком необходимых строительных компонентов и обеспечивает биоэнергетические потребности организма. Так, в § 1.2 уже отмечалось, что окисление глюкозы и других органических соединений атмосферным кислородом является важнейшим источником энергии у аэробных, не способных к фотосинтезу организмов. Процессы окислительной и неокислительной деструкции также являются многостадийными и проходят через ряд промежуточных соединений. Например, важным этапом окислительной деградации глюкозы является ее превращение в соль пировиноградной кислоты — пируват CH_3COCOO^-. Этот процесс, который детально рассматривается в § 8.2, проходит через образование девяти промежуточных соединений. Дальнейшее полное сгорание пирувата до CO_2 и воды проходит еще через одиннадцать промежуточных веществ (см. § 8.4).

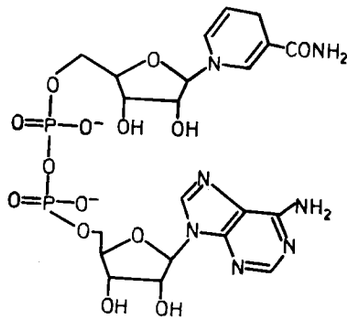
Таким образом, в синтезе и деструкции низкомолекулярных соединений участвуют сотни различных органических веществ. Однако ими многообразие природных органических соединений далеко не исчерпывается. Имеется ряд других классов органических веществ, образующихся и функционирующих в живой природе. Ниже перечислены важнейшие из этих классов.

Прежде всего следует упомянуть группу веществ, являющихся *кофакторами* ферментов, которые столь же универсальны в живой природе, как и аминокислоты, нуклеотиды, фосфолипиды, сахара. Органические кофакторы являются необходимыми компонентами значительного числа (хотя далеко не всех) ферментов. Примером может служить уже описанный в § 1.1 гем — кофактор многих ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, в том числе упоминавшейся каталазы. Систематическое рассмотрение кофакторов проводится в гл. 4. Близко к ним примыкают *коферменты* — органические соединения, содержащиеся в живых организмах в сравнительно небольших количествах и циклически функционирующие в определенных системах ферментативных реакций. Классическим примером кофермента является *никотинамидадениндинуклеотид* или сокращенно НАД (по лат. NAD). В окисленной форме (NAD^+) (47 а)



47а

выступает в качестве окислителя в подавляющем большинстве процессов превращения спиртовых групп в карбонильные и альдегидных групп в карбоксильные. При этом образуется восстановленная форма NAD·H (47 б)



47б

Ферменты, катализирующие эти превращения, называют дегидрогеназами. Так, окисление этанола в живых организмах происходит с помощью фермента *алкоголь дегидрогеназы*, катализирующей превращение:

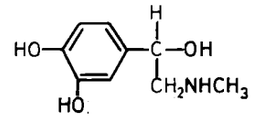
$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NAD\cdot H + H^+$$

У аэробных организмов NAD·H, накапливающийся в результате многочисленных окислительно-восстановительных процессов, подвергается окислению кислородом в сложной надмолекулярной системе, называемой цепью переноса электронов, причем этот процесс сопровождается фосфорилированием трех молекул АДФ на каждую окисленную молекулу NAD·H. У эукариот эта система вмонтирована во внутреннюю мембрану митохондрий. Цепь переноса электронов рассмотрена в § 8.5.

Как видно из приведенных примеров, кофакторы ферментов и коферменты являются зачастую достаточно сложными органическими молекулами. Поэтому многие из них у ряда животных синтезируются из достаточно сложных предшественников, которые должны присутствовать в качестве обязательных компонентов пищи. Такие вещества-предшественники называют *витаминами* (см. § 4.7).

Остальные группы природных органических соединений значительно более специализированы. Для высших животных с развитой нервной и эндокринной системами характерно образование и функционирование ряда веществ, управляющих работой этих систем, соответственно нейромедиаторов и гормонов. Примером нейромедиатора является описанный в § 1.4 ацетилхолин. Гормоны в первую очередь представлены рядом стероидов, например рассмотренные в § 2.4 половые гормоны, и некоторыми пептидами и белками.

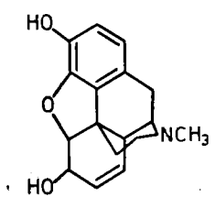
Примерами последних могут служить вазопрессин (см. рис. 2) и инсулин (см. рис. 3). Некоторые гормоны представляют собой катехоламины, как, например, *адреналин* (48)



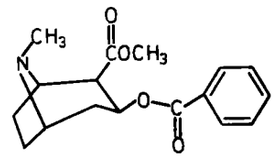
48

— гормон, выделяемый корой надпочечников, запускающий окислительную переработку гликогена в процессе интенсивной мышечной работы, в том числе в стрессовых ситуациях.

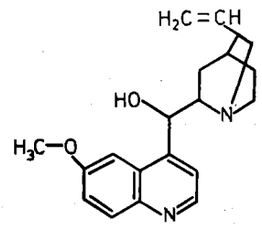
Во многих растениях синтезируются сложные, обычно характерные для данного вида амины, обладающие разнообразным биологическим действием и объединяемые под общим названием *алкалоиды*. В настоящее время выделено и исследовано более пяти тысяч различных алкалоидов. К их числу относятся такие широко известные вещества, как *морфин* (49), используемый в качестве болеутоляющего средства, который добывают из специальных видов мака; *кокаин* (50), выделяемый из листьев кокаинового куста и широко применяемый для местного обезболивания; знаменитый антималярийный препарат *хинин* (51), содержащийся в коре хинного дерева; *кофеин* (52) — возбуждающий компонент чая и кофе — и многие другие:



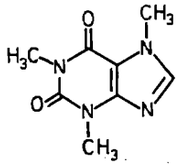
49



50



51

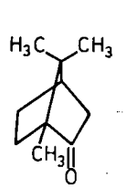


52

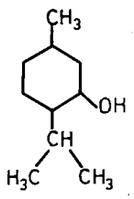
Большую группу природных соединений растительного происхождения, насчитывающую тысячи изученных представителей, составляют терпены — компоненты эфирных масел и смол, построенные из нескольких, нередко частично окисленных изопреновых фрагментов.

В качестве примеров можно привести такие хорошо известные вещества, как *камфора* (53) и *ментол* (54). Среди терпенов имеются соединения, с помощью

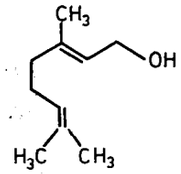
которых растения привлекают насекомых-опылителей. Так, одним из компонентов нектара шиповника является *гераниол* (55). Терпены, входящие в состав смол хвойных деревьев, защищают их от микроорганизмов и вредных насекомых:



53



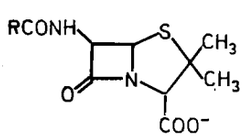
54



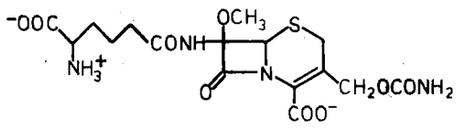
55

Большую и чрезвычайно важную в практическом отношении группу природных органических соединений составляют *антибиотики* — вещества микробного происхождения, выделяемые специальными видами микроорганизмов и подавляющие рост других, конкурирующих микроорганизмов. Открытие и применение антибиотиков произвело в 40-е годы революцию в лечении инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями. Следует отметить, что на вирусы в подавляющем большинстве случаев антибиотики не действуют и применение их в качестве противовирусных препаратов неэффективно.

Первыми в практику были введены антибиотики группы *пенициллина* (56). Примерами их могут служить *бензилпенициллин* (56 а) и *ампициллин* (56 б). Сходны с ними по строению антибиотики группы *цефалоспоринов*, примером которых может служить *цефамицин* С (57):



56а,б

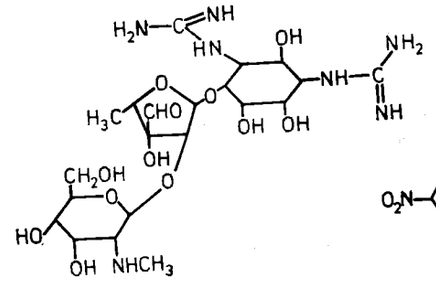


57

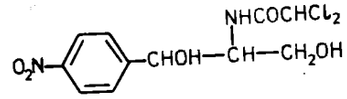
а) R = $C_6H_5CH_2$—
б) R = $C_6H_5C(NH_2)H$—

Общим у этих антибиотиков является наличие β-лактамного кольца. Механизм действия их состоит в торможении одной из стадий формирования муреина — пептидогликана, формирующего клеточную стенку бактерий.

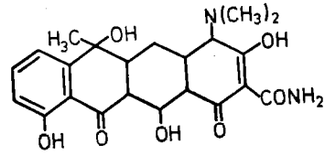
Антибиотики чрезвычайно разнообразны как по химической природе, так и по механизму действия. Некоторые из широко используемых антибиотиков взаимодействуют с рибосомами бактерий, тормозя биосинтез белка в бактериальных клетках, в то же время практически не взаимодействуют с эукариотическими рибосомами. Поэтому они губительны для бактериальных клеток и мало токсичны для человека и животных. К их числу относятся такие хорошо известные антибиотики, как *стрептомицин* (58), *хлорамфеникол* (*левомицетин*) (59), *тетрациклин* (60). Один из самых эффективных противотуберкулезных препаратов — антибиотик *рифампицин* (61) — блокирует работу прокариотических РНК-полимераз — ферментов, катализирующих биосинтез РНК, — связываясь с ферментом, но в то же время не обладает способностью связываться с РНК-полимеразами эукариот:



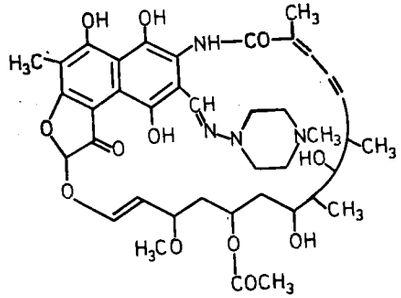
58



59

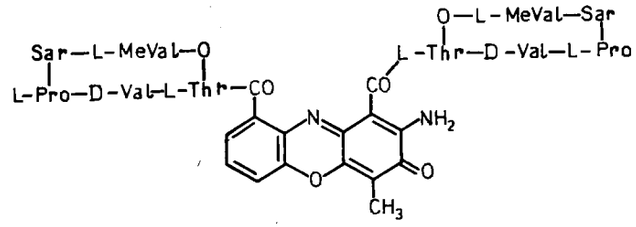


60



61

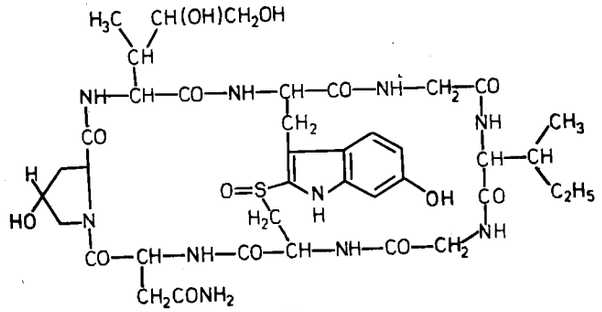
Интенсивно исследуются антибиотики, взаимодействующие с ДНК и этим нарушающие процессы, связанные с размножением и реализацией заложенной в ней наследственной информации. Антибиотики с таким механизмом действия обычно высокотоксичны и в качестве антибактериальных препаратов не используются, но находят применение в химиотерапии злокачественных опухолей. В качестве примера можно привести широко используемый в биохимических исследованиях *актиномицин D* (62):



62

Здесь Sar — саркозин (N-метилглицин). *L*-Метилвалин связан эфирной связью с ОН-группой треонина.

Ряд живых организмов в качестве защиты от потенциальных врагов вырабатывают сильно ядовитые вещества — токсины. Многие из них являются белками, однако встречаются среди них и низкомолекулярные сложные органические молекулы. В качестве примера такого вещества можно привести ядовитое начало бледной поганки — *α-аманитин* (63):



63

Это соединение специфично блокирует синтез эукариотических информационных РНК. Для человека смертельной дозой является несколько миллиграммов этого токсина.

2.6. ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЖИВОЙ МАТЕРИИ

Органические соединения, образующие живую материю, состоят из общих для всех органических соединений углерода и водорода, в большом числе случаев в них входят также кислород, азот, ряд важных соединений содержат серу и фосфор. Эти же элементы представлены в живой природе и в виде целого ряда неорганических соединений, прежде всего воды, солей аммония, карбонатов, сульфатов, орто- и пирофосфатов, и являются главными биогенными элементами. Вместе с тем функционирование живой материи требует участия целого ряда других элементов, как металлов, так и неметаллов.

Из неметаллов помимо уже упомянутых в первую очередь следует отметить хлор, который в виде анионов участвует в создании солевой среды и, кроме того, иногда входит в состав органических соединений, как это уже было продемонстрировано на примере хлорамфеникола (59).

Для поддержания определенной ионной силы и создания буферной среды необходимо участие однозарядных катионов — ионов аммония, натрия и калия. Эти катионы в биологических системах не являются взаимозаменяемыми, и существуют специальные механизмы, поддерживающие необходимый баланс между ними. Об одном из них, K,Na-зависимой АТФазе, вкратце говорилось в § 2.1.

Из неметаллов седьмой группы периодической системы элементов достоверно установлено участие в некоторых процессах жизнедеятельности органических соединений иода. Иод входит в состав гормонов щитовидной железы — производных аминокислоты тирозина — тиронина и тироксина, содержащих соответственно три или четыре атома иода, соединенных с бензольным кольцом. С этим связана повышенная опасность попадания в организм радиоактивных изотопов иода, которые, накапливаясь в щитовидной железе, вызывают ее повреждение. В то же время, будучи использованы в малых дозах, они облегчают наблюдение за состоянием щитовидной железы по испускаемому γ-излучению.

Из неметаллов шестой группы помимо серы в некоторых процессах жизнедеятельности участвуют соединения селена, главным образом в виде селенового аналога — цистеина (селеноцистеин). Последний входит в состав некоторых ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

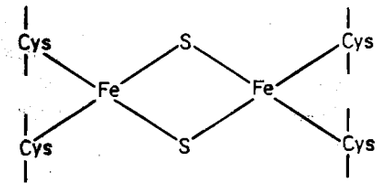
Кремний довольно широко распространен у некоторых типов организмов, в том числе у некоторых групп растений, губок и моллюсков. Так, из SiO_2 построен скелет одноклеточных диатомовых водорослей, являющихся важным компонентом фитопланктона. У моллюсков он составляет основу зубцов. В незначительном количестве кремний содержится в некоторых тканях высших животных — в хрящах и связках его содержание может достигать нескольких сотых долей процента. По-видимому, в виде эфиров ортокремниевой кислоты он принимает участие в сшивке полисахаридных цепей.

Из щелочно-земельных металлов в биологических системах повсеместно распространены магний и кальций. Многие эфиры и ангидриды фосфорной кислоты функционируют в виде магниевых солей. Концентрация ионов магния в клетках имеет исключительно важное значение для поддержания целостности и функционирования рибосом, т.е. для синтеза белков. Кроме того, магний входит в состав хлорофилла — основного пигмента зеленых растений, непосредственно поглощающего кванты видимого света для использования их энергии при фотосинтезе. Ионы кальция принимают участие в регуляции ряда важных клеточных процессов, в том числе мышечного сокращения и других двигательных функций. Кроме того, нерастворимые соли кальция участвуют в формировании опорных структур: фосфат кальция — в формировании костей, карбонат кальция — в образовании раковин моллюсков.

Ряд ионов металлов, в основном четвертого периода периодической системы элементов, играет важную роль в качестве кофакторов белков при выполнении ими каталитических и некоторых других функций. Среди них приоритетное место занимает железо. В § 1.1 уже говорилось о железопорфиринах, которые, связываясь с белками, образуют *гемопротеиды* — комплексы, выполняющие ряд жизненно важных функций. Среди них имеются и ферменты, например уже упоминавшаяся каталаза, и переносчики кислорода (гемоглобин), и переносчики электронов. К числу последних относится *цитохром с* — гемопротеид, образованный небольшим белком, который двумя остатками цистеина связан ковалентно с гемом по его винильным радикалам. Цитохром *с* является участником одного из важнейших процессов в биосфере, свойственного всем аэробным организмам, — переноса электронов от $NAD \cdot H$ к O_2.

Наряду с гемопротеидами широко распространены белки, содержащие железо в виде железосерных кластеров (*негемовое железо*). Эти белки играют важную роль в многочисленных процессах переноса электронов — при фотосинтезе, окислительном фосфорилировании, для восстановления азота до аммиака азотфиксирующими бактериями. Наиболее изучены железосерные белки из хлоропластов зеленых растений и бактериальные белки, известные под общим названием *фер-*

редоксины. Многие из них выделены в индивидуальном виде. Атомы железа в ферредоксинах связаны с белком через атомы серы остатков цистеина (Cys) и, кроме того, соединены между собой мостиками из атомов серы. Например, структура железосерного фрагмента ферредоксина из листьев шпината имеет вид



Встречаются и ферредоксины с более сложными кластерами. Например, ферредоксин из пурпурной серной бактерии Chromatium имеет в своем составе кластер из четырех атомов железа и четырех мостиковых атомов серы (рис. 8).

Медь является кофактором значительного числа ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные процессы. Среди ферментов, содержащих ионы меди, особо следует упомянуть *цитохром с оксидазу*, фермент, катализирующий окисление восстановленной формы цитохрома *с* кислородом в цепи переноса электронов от NAD·H к O_2.

Значительное число ферментов с довольно разнообразным механизмом действия содержат в качестве кофактора ионы цинка. Среди них уже упоминавшаяся карбоангидраза. Цинк входит в качестве обязательного компонента во многие ферменты, участвующие в биосинтезе нуклеиновых кислот — РНК- и ДНК-полимеразы, а также в некоторые ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей.

Среди остальных металлов четвертого и пятого периодов следует упомянуть марганец, кобальт и молибден. Марганец входит в состав сравнительно неболь-

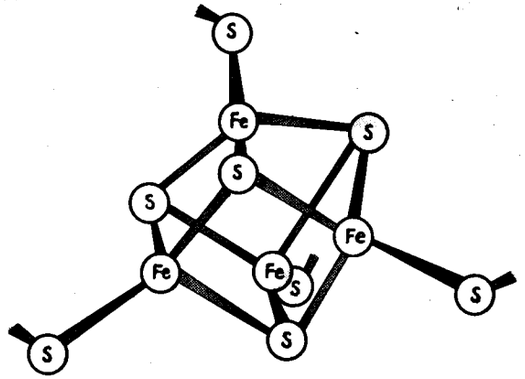
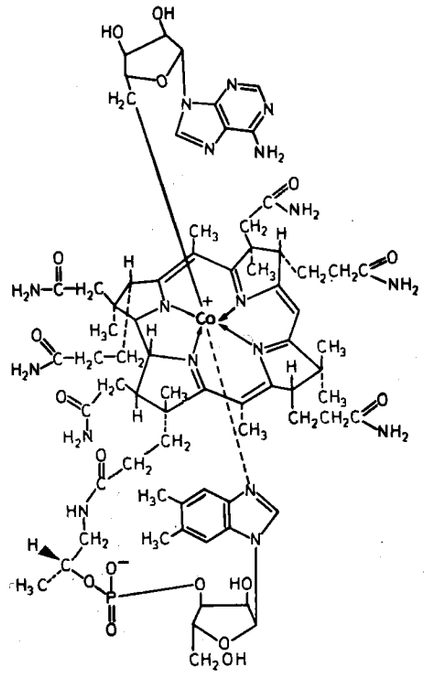


Рис. 8. Структура железосерного фрагмента ферредоксина серной бактерии *Chromatium*

шого числа ферментов, но играет фундаментальную роль в биосфере, поскольку его участием в зеленых растениях происходит фотохимическое восстановление воды, обеспечивающее выделение в атмосферу кислорода и поступление электронов в цепь переноса электронов при фотосинтезе.

Кобальт входит в состав нескольких ферментов в виде *кобаламинов*, к числу которых относится *витамин* B_{12} (64):



64

В этом кофакторе реализуется уникальная в живой природе связь металл — углерод с атомом C5 5-дезоксиаденозина. Как видно из приведенной формулы, гексакоординированный кобальт находится в центре корриновой системы, сходной с порфириновой [сравните с гемом (1)], но лишенной одного из метилиденовых мостиков, связывающих пиррольные кольца.

Молибден является необходимым компонентом фермента нитрогеназы, который катализирует в специальных азотфиксирующих бактериях восстановление атмосферного азота до аммиака. Это важнейший путь поступления азота в биосферу, поскольку образование практически всех природных азотсодержащих органических соединений идет из аммиака или, точнее, из ионов аммония.

ГЛАВА 3

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БИОПОЛИМЕРОВ И ЕЕ РОЛЬ В ОБЕСПЕЧЕНИИ СПЕЦИФИЧНОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ. НЕКОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

3.1. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ НЕКОВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

В организации и функционировании живой материи исключительно важную роль играют нековалентные взаимодействия. Роль их в формировании клеток и клеточных органелл, в выполнении белками и нуклеиновыми кислотами их наиболее тонких функций неизмеримо важнее и многограннее, чем в поведении низкомолекулярных соединений в растворе и твердой фазе и обычных высокомолекулярных соединений, построенных из регулярно чередующихся однотипных мономерных единиц.

Прежде всего эта роль определяется значением нековалентных взаимодействий в формировании пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот. В полипептидной цепи каждый хиральный атом углерода связан простыми σ-связями с группами C=O и NH, что означает возможность заторможенного вращения с низким активационным барьером вокруг этих связей. Вращение вокруг собственно-пептидной связи затруднено, поскольку вследствие p,π-сопряжения эта связь не является строго одинарной. Таким образом, в полипептидной цепи длиной N аминокислотных остатков возможно заторможенное вращение вокруг $2N$ связей. Если принять, естественно с некоторой степенью условности, что каждой из таких связей соответствуют три значения торсионных углов, соответствующих минимумам потенциальной энергии вращения (по аналогии с классической картинкой для вращения вокруг связи C—C в дихлорэтане), то число различных конформаций, которое может принимать полипептидная цепь, составит $3^{2N} \approx 10^N$. Считая, опять-таки с большим элементом условности, что время отдельного поворота вокруг σ-связи имеет порядок 10^{-10}с и вращение вокруг всех связей может происходить независимо друг от друга, число поворотов в секунду можно оценить как $2N \cdot 10^{10}$, что для небольшого белка, состоящего всего из 100 аминокислотных остатков, составит $2 \cdot 10^{12}$. Если бы молекула белка представляла собой статистический клубок, непрерывно случайным образом изменяющий свою конформацию, то некоторую биологически значимую конформацию, необходимую для функционирования белковой молекулы, она принимала бы один раз за 10^{88}с, что абсурдно велико не только по сравнению с временем, реально необходимым для выполнения той или иной функции, но и с временем существования Вселенной вообще. Аналогичная оценка, проведенная для такой достаточно сложной органической молекулы, как NAD, где основная цепочка атомов содержит 14 таких σ-связей, показывает, что время, необходимое для достижения некоторой определенной конформации, существенной для функционирования этой молекулы в химических превращениях и в биохимических системах, составит величину порядка 0,07 с, т.е. в течение одной секунды любая, в том числе нужная для данного процесса, конформация будет неоднократно достигаться. Из этих оценок видно, что отсутствие предопределенной пространственной структуры у сложной органической молекулы может лишь повлиять на скорость процесса, протекающего с участием этой молекулы, в то время как для белковых молекул отсутствие такой необходимой структуры делает в принципе невозможным протекание соответствующего процесса ни в каком разумном масштабе времени. Это же в равной мере относится и к нуклеиновым кислотам.

В то же время очевидно, что белок может оказаться зафиксированным в определенной пространственной организации, только если в пределах его молекулы и ее окружения будут действовать силы, стабилизирующие эту организацию. Таковыми являются силы нековалентного взаимодействия между различными, в том числе и достаточно далеко расположенными друг от друга вдоль полипептидной цепи, аминокислотными остатками и пептидными группами. В дополнение к ним, как уже говорилось в § 2.1 на примере инсулина, отдельные части одной и той же или двух разных цепей могут быть скреплены дисульфидными мостиками, однако это имеет место далеко не у всех белков и даже там, где такие мостики существуют, роль нековалентных взаимодействий всегда приоритетна.

В большом числе случаев белки в клетках не существуют поодиночке, а образуют сложные надмолекулярные агрегаты определенного строения, состоящие из нескольких белков или из белков и нуклеиновых кислот. Последние называют нуклеопротеидами. Примером нуклеопротеида являются рибосомы, на которых идет синтез новых белковых молекул (см. § 1.1). Они состоят из нескольких молекул РНК и нескольких десятков белков. При выполнении условия комплементарности нуклеотидных последовательностей две цепи нуклеиновой кислоты образуют единый комплекс, называемый двойной спиралью. Во всех этих случаях сложные молекулы удерживаются в единой структуре в результате нековалентных взаимодействий.

Наконец, в § 2.1 уже обращалось внимание на то, что в основе всех наиболее тонких функций белков лежит их способность к опознаванию определенных партнеров (лигандов), что означает образование особенно прочных комплексов именно с этими партнерами. Эти комплексы опять-таки образуются в результате нековалентных взаимодействий белка с опознаваемым лигандом.

Таким образом, нековалентные взаимодействия в пределах каждой молекулы биополимеров обеспечивают необходимую для ее функционирования пространственную структуру, обеспечивают надмолекулярную организацию биополимеров и важнейший этап в их функционировании — узнавание ими своих партнеров.

В биохимических системах важную роль играют все три главных типа нековалентных взаимодействий:

1) электростатическое притяжение разноименно заряженных групп;

2) образование водородных связей (водородных мостиков) между полярными группами (X—H) и донорами неподеленной пары электронов (:Y): X—H$\cdots$ Y, где X и Y в подавляющем большинстве случаев элементы второго периода периодической системы элементов, т.е. N, O или F;

3) ван-дер-ваальсовы взаимодействия, обусловленные притяжением постоянных, наведенных или виртуальных диполей.

Отрицательный заряд в определенных точках сложных органических молекул, в том числе молекул важнейших биополимеров, возникает, если они содержат

электронейтральные группы, способные отдавать протон окружающим молекулам воды, т.е. группы, обладающие свойством кислоты. Положительный заряд возникает на группах, способных отнимать протон у молекул воды, т.е. на группах, обладающих достаточно высокой основностью. При этом для биохимических процессов имеют значения только заряды тех групп, которые в заметной степени ионизуются или соответственно протонируются в диапазоне значений pH 1–12. Значения pH вне этого диапазона, как правило, биологически нефункциональны. Ионизация или присоединение протона вне этого диапазона могут иметь значение лишь для протекания химических превращений, чаще всего связанных с деструкцией этих молекул и поэтому смертельно опасных для живых организмов. Так, пептидная группа —NH—CO— в составе биологически активной молекулы белка может быть только электронейтральной, поскольку в заметной степени может протонироваться лишь при отрицательных значениях функции кислотности среды*. При этом она становится высокоэлектрофильной и довольно легко атакуется молекулами воды, что приводит к ее гидролизу (см. § 7.3.).

Группы, ионизация или протонирование которых дает определенный вклад в заряд белковых молекул, приведены в табл. 3.1. Для ориентировки в таблице приведены значения pK этих групп в составе соответствующих аминокислот, а для концевой аминогруппы и концевой карбоксильной группы — в составе дипептида глицилглицина. Эти величины для аминокислот в составе белковых молекул могут существенно варьироваться в зависимости от того, в каком окружении они находятся, т.е. в зависимости от первичной и пространственной структуры белка. Как правило, эти вариации лежат в пределах одной единицы логарифмической шкалы в ту и другую сторону, однако в некоторых специальных случаях значения pK соответствующего радикала могут отличаться от приведенного в таблице на несколько единиц. В соответствии с основным уравнением кислотно-основного равновесия — уравнением Гендерсона

$$pH = pK + \lg(a_B/a_{BH^+}) \quad \text{или} \quad pH = pK + \lg(a_{A^-}/a_{HA}),$$

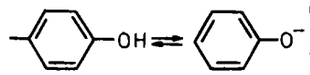
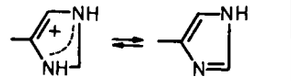
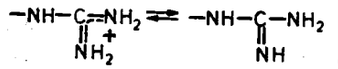
где B — основание; HA — кислота; a_i — соответствующие активности; в равновесии резко преобладает кислая форма, если pH среды на единицу и более ниже значения pK, и основная форма, если pH среды на единицу и более превышает это значение. При значениях pH, близких к значению pK соответствующей группы, в равновесии в соизмеримых количествах присутствуют обе формы.

В соответствии со сказанным при нейтральном pH носителями отрицательного заряда белковой молекулы являются карбоксильные группы аспартата и глутамата, а также C-концевая карбоксильная группа, которая может принадлежать любой аминокислоте. Аналогично, носителями положительного заряда в нейтральной среде в первую очередь являются остатки лизина и аргинина, аминогруппа N-концевой аминокислоты и в некоторой степени остатки гистидина. Белки, у которых число карбоксильных групп существенно превышает число остатков аргинина и лизина в нейтральной среде, имеют отрицательный заряд и относятся к числу *кислых белков*. Наоборот, белки, у которых остатки лизина и аргинина преобладают по сравнению с остатками аспартата и глутамата, в нейтральной среде заряжены положительно и называются *основными белками*.

При изменении pH среды заряд белковой молекулы уменьшается, переходя от положительных значений при достаточно низких значениях pH к отрицательным при достаточно высоких pH. Естественно, что этот переход является плавным и существует значение pH, при котором средний заряд молекулы белка равен нулю. Это значение называют *изоэлектрической точкой* белка (pI). Очевидно, что кислые белки характеризуются значениями изоэлектрической точки ниже 7, а основные — выше 7 (табл. 3.2).

*Функция кислотности среды является эквивалентом величины pH для достаточно концентрированных растворов кислот, в которых концентрация ионов водорода переста

Таблица 3.1. Ионизируемые и протонируемые группы в белках и значения pK этих групп в составе соответствующих аминокислот и пептидов*

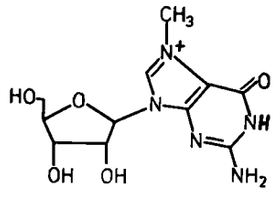
Кислая и основная формы группы	Аминокислота или пептид	pK
$\alpha\text{-COOH} \rightleftharpoons \alpha\text{-COO}^-$	Глицилглицин	3,1
$\beta\text{-COOH} \rightleftharpoons \beta\text{-COO}^-$	Аспартат	3,9
$\gamma\text{-COOH} \rightleftharpoons \gamma\text{-COO}^-$	Глутамат	4,25
$\text{-SH} \rightleftharpoons \text{-S}^-$	Цистеин	8,3
	Тирозин	10,1
	Гистидин	6,0
$\alpha\text{-}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \rightleftharpoons \alpha\text{-NH}_2$	Глицилглицин	8,1
$\varepsilon\text{-}\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \rightleftharpoons \varepsilon\text{-NH}_2$	Лизин	10,5
	Аргинин	12,5

*Здесь и далее речь идет о $pK = -\lg K_a$, где K_a — константа ионизации кислоты в сопряженной паре HA/A^- или BH^+/B.

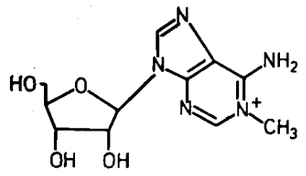
Таблица 3.2. Значения pI некоторых белков

Белок	pI	Белок	pI
Цитохром c	10,6	Коллаген	6,6–6,8
Рибонуклеаза	7,8	Карбоксипептидаза	6,0
Миоглобин	7,0	Каталаза	5,6
Гемоглобин:		Инсулин	5,35
лошади	6,92	Родопсин	4,47–4,57
человека	7,07	Пепсин	1,0
γ-Глобулин	6,4–7,2		

Нуклеиновые кислоты являются полианионами, поскольку значения pK межнуклеотидных диэфирных фосфатов лежат в пределах 2–3. Гетероциклы при нейтральных pH не несут электрического заряда, и, по-видимому, заряженные формы этих гетероциклов биологической роли не играют. Исключение составляют некоторые минорные нуклеотиды, например N7-метилгуанозин или N1-метиладенозин, которые могут входить в состав рибонуклеиновых кислот:



N 7-метилгуанозин



N1- метиладенозин

При отклонении pH на несколько единиц от нейтрального значения происходят ионизация групп N—H в слабощелочной среде и протонирование атомов азота пиридинового типа в кислой среде. В табл. 3.3. приведены значения pK для важнейших нуклеозидов. Однако надо иметь в виду, что в составе нуклеиновых кислот эти значения могут заметно отличаться от pK для свободных нуклеозидов. Следует подчеркнуть, что наиболее основными и нуклеофильными центрами в гетероциклах, как это следует из спектральных характеристик ионизованных форм этих гетероциклов и из квантово-химических расчетов, являются именно атомы азота пиридинового типа в составе цикла, а не экзоциклические аминогруппы, неподеленная пара электронов которых сопряжена с системой двойных связей кольца и групп C=O. В биологически значимом диапазоне pH уридин и тимидин не присоединяют протонов и не являются основаниями. В связи с этим широко используемый для гетероциклов, входящих в состав нуклеиновых кислот, собирательный термин «основания», строго говоря, является некорректным.

Полимерными носителями электрических зарядов являются также мукополисахариды. Кроме того, носителями зарядов являются многочисленные низкомолекулярные участники обмена веществ. Например, обмен моносахаридов — их образование при фотосинтезе, их деструкция, в том числе окислительная, — проходит

Таблица 3.3. Значения pK нуклеозидов

Нуклеозид	Ионизированный или протонированный атом N	pK
Тимидин	$N(3)-H \rightleftharpoons N(3)^-$	9,68
Уридин	$N(3)-H \rightleftharpoons N(3)^-$	9,25
Гуанозин	$N(1)-H \rightleftharpoons N(1)^-$	9,22
Цитидин	$N(3) \rightleftharpoons N(3)-H^+$	4,2
Аденозин	$N(1) \rightleftharpoons N(1)-H^+$	3,6
Гуанозин	$N(7) \rightleftharpoons N(7)-H^+$	2,20

на уровне соответствующих эфиров фосфорной кислоты. Так, деструкция глюкозы начинается в форме глюкозо-6-фосфата, причем остаток фосфорной кислоты сохраняется на всех промежуточных стадиях процесса до момента образования пирувата (соли пировиноградной кислоты) CH_3COCOO^-, который в нейтральной среде несет отрицательный заряд (см. § 8.2). Это характерно и для большого числа других систем биохимических процессов, рассматриваемых в данном курсе.

Атомы N и O, склонные к образованию водородных связей, относятся вместе с атомами C и H к числу важнейших биогенных элементов, а образование водородных связей играет исключительно важную роль в общем балансе нековалентных взаимодействий в биохимических системах. Особое значение водородные связи имеют в связи с тем, что все биохимические процессы, за исключением протекающих внутри фосфолипидных бислоев, проходят в воде, которая является одновременно и донором протонов и донором неподеленных пар электронов. Поэтому группы, способные участвовать в образовании водородных связей, могут взаимодействовать с молекулами воды. Такие группы получили название *гидрофильных групп*. К гидрофильным группам следует также отнести заряженные фрагменты молекул, взаимодействующие с водой по ион-дипольному механизму с образованием прочных гидратных оболочек.

В белках гидрофильными фрагментами являются прежде всего остатки аспартата, глутамата, аргинина и лизина как в заряженной, так и в электронейтральной формах. Гидрофильной является пептидная группа —NH—CO—, у которой амидный фрагмент может выступать как донор протона, а карбонильная группа — как донор электронной пары. По этой же причине гидрофильны остатки аспарагина и глутамина, содержащие фрагмент $-CO-NH_2$. Гидрофильными являются гидроксигруппы остатков серина, треонина и тирозина и имидазольное кольцо гистидина. Значительно менее гидрофилен боковой радикал цистеина, так как способность к образованию водородной связи у группы SH существенно ниже, чем у OH.

Таблица 3.4. Гидрофильные фрагменты азотсодержащих гетероциклов главных компонентов нуклеиновых кислот

Гетероцикл	Доноры протонов	Доноры неподеленных пар электронов	Гетероцикл	Доноры протонов	Доноры неподеленных пар электронов
Уридин и тимидин	N(3)—H	C(2) = O, C(4) = O	Аденозин	N(6)—H	N(1), N(3), N(7)
			Гуанозин	N(2)—H,	C(6) = O, N(3),
Цитидин	N(4)—H	C(2) = O, N(3)		N(1)—H	N(7)

Нуклеотидные остатки нуклеиновых кислот буквально насыщены участками, способными к образованию водородных связей. Это и остатки фосфорной кислоты, и атом O фуранозного цикла, и 2′-OH-группы рибозы в составе РНК. Наибольшее значение для пространственной организации молекул нуклеиновых кислот и их межмолекулярных взаимодействий имеют гидрофильные фрагменты гетероциклов. Эти фрагменты сведены в табл. 3.4. Важной чертой всех приведен-

ных в этой таблице орбиталей неподеленных пар электронов и полярных N—H-групп является то, что все они находятся в плоскости гетероцикла и поэтому способствуют взаимодействию между гетероциклами, находящимися в пределах одной плоскости. Среди многочисленных типов взаимодействий между разными комбинациями гетероциклов особенно важное значение для функционирования нуклеиновых кислот имеют взаимодействия между расположенными в одной плоскости парами аденин–тимин (или урацил) и гуанин–цитозин (рис. 9). Подробнее этот вопрос рассматривается в § 3.4 и 3.5.

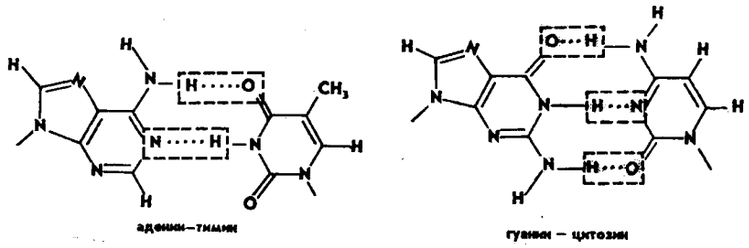


Рис. 9. Водородные связи между парами гетероциклов аденин–тимин и гуанин–цитозин

Участие в образовании водородных связей свойственно и большинству других высокомолекулярных и низкомолекулярных компонентов живой природы. Большое значение эти связи имеют в структуре полисахаридов. Например, механическая прочность целлюлозы и ее нерастворимость в воде обусловлены наличием между соседними полимерными цепями большого числа прочных водородных связей, образованных гидроксигруппами, которых имеется по три на каждое мономерное звено, и атомами кислорода соседних цепей как донорами неподеленной пары электронов.

Образование водородных связей с соответствующими белками является одним из основных факторов, обеспечивающих специфическое комплексообразование низкомолекулярных соединений с определенными участками белковых молекул.

Электростатические взаимодействия и образование водородных связей — довольно специфические процессы. Первые возникают, если вблизи друг от друга оказываются положительно и отрицательно заряженные группы, вторые — если достаточно сближенными оказываются группа O—H или N—H и атом O или N, имеющие неподеленную пару электронов.

В отличие от этого способность к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям свойственна всем атомам и радикалам, т.е. они мало специфичны. Однако у гидрофильных фрагментов эти взаимодействия играют второстепенную роль по сравнению с более сильными специфическими взаимодействиями. В то же время у электронейтральных атомов или радикалов, не способных к образованию водородных связей, ван-дер-ваальсово притяжение является основным видом нековалентного взаимодействия. Такие группы, лишенные специфического сродства к молекулам воды, получили название *гидрофобных*. В водных растворах, в которых только и функционируют биохимические системы, наличие гидрофобных групп проявляется в виде специфического эффекта, получившего название *гидрофобных взаимодействий*.

Рассуждая упрощенно, можно сказать, что контакт с молекулами воды гидрофобных атомов или радикалов, к числу которых относятся углеводородные радикалы и атомы серы, «невыгоден» молекулам воды, которые предпочитают образовывать водородные связи с гидрофильными молекулами или группами. Поэтому термодинамически более выгодно в водном растворе объединение гидрофобных радикалов в кластеры, что сводит к минимуму их контакты с водой. Именно эта тенденция гидрофобных радикалов в водных растворах избегать контактов с молекулами воды и объединяться в гидрофобные кластеры известна под названием «гидрофобные взаимодействия». Уместно вспомнить, что такие взаимодействия являются движущей силой образования бислойных фосфолипидных мембран, описанных в § 2.4.

Более углубленное рассмотрение вопроса, учитывающее сложную структуру жидкой воды, показывает, что гидрофобные взаимодействия обусловлены изменением структуры микрокристаллов воды в контакте с гидрофобными атомами или группами. Эта структура более упорядочена, чем та, которая свойственна чистой воде или водным растворам гидрофильных веществ. Поэтому появление в воде гидрофобных центров приводит к уменьшению энтропии воды, а объединение гидрофобных центров в кластеры происходит в результате тенденции к возрастанию энтропии. Поэтому говорят, что гидрофобные взаимодействия имеют энтропийную природу. Независимо от трактовки существенно подчеркнуть, что гидрофобные взаимодействия — это не какой-то особый тип взаимодействия, а лишь способ оптимизации пространственной структуры сложных систем, содержащих одновременно гидрофобные и гидрофильные фрагменты, присущий именно водным растворам.

В белках к числу наиболее гидрофобных аминокислотных остатков относятся остатки валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, пролина, метионина, триптофана и тирозина. Два последних, правда, содержат и гидрофильные фрагменты, соответственно N—H и O—H, однако большой объем гидрофобной части придает им преимущественно гидрофобный характер.

Своеобразный тип гидрофобных взаимодействий наблюдается в нуклеиновых кислотах между гетероциклами. Как уже указывалось, им свойственно образование водородных связей в плоскости колец. В направлении, перпендикулярном плоскости, таких взаимодействий не происходит и энергетически выгодным оказывается параллельное расположение циклов в виде системы, напоминающей стопку бумаг. Это является результатом диполь-дипольных взаимодействий, достаточно сильных вследствие полярности гетероциклов. Такие взаимодействия, по основной классификации относящиеся к ван-дер-ваальсовым, часто называют *межплоскостными* или *стекинг-взаимодействиями*. Плоская структура гетероциклов допускает сближение до 0,3 нм, и так как ван-дер-ваальсовы силы очень резко возрастают с уменьшением расстояния, то стекинг-взаимодействия оказываются важным стабилизирующим фактором в структуре нуклеиновых кислот. Естественно, что в подобных взаимодействиях могут участвовать и другие плоские ароматические системы, в частности радикалы ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана.

3.2. МОЛЕКУЛЯРНОЕ УЗНАВАНИЕ В БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Уже неоднократно говорилось, что важнейшей для функционирования биополимеров особенностью является их способность с высокой степенью избирательности образовывать комплексы с определенными низко- или высокомолекулярными партнерами или, как принято говорить в биохимии, узнавать этих партнеров. Избирательность означает, что константа ассоциации образования специфического комплекса биополимера с узнаваемым партнером существенно превышает константу для комплексов того же биополимера с другими компонентами системы.

Образование комплексов происходит за счет нековалентных взаимодействий. Некоторая избирательность заложена в самой природе этих взаимодействий, но она не слишком высока. Так, положительно заряженные группы притягиваются именно к отрицательно заряженным. Однако отличия в энергиях электростатического взаимодействия с различными отрицательно заряженными группами в образующихся ионных парах варьируют в не очень широких пределах. То же можно сказать про образование водородных связей между каким-либо атомом — донором протона — и несколькими различными акцепторами протона, т.е. атомами N, O или F, имеющими неподеленную пару электронов, и про образование гидрофобных кластеров между каким-либо неполярным радикалом и другими гидрофобными фрагментами. В этих случаях также имеется вполне определенная и в то же время невысокая избирательность взаимодействия.

Эта избирательность может существенно возрасти, если контакт между взаимодействующими партнерами — молекулами или их фрагментами — становится многоточечным. При этом возрастает число комбинаций попарно взаимодействующих атомов или радикалов и, что особенно существенно, число мыслимых взаимных расположений этих атомов и радикалов, которые у двух образующих комплекс участников должны соответствовать друг другу так, чтобы мог реализоваться весь набор контактов. Структуры, удовлетворяющие этому требованию, называют комплементарными. Описанные в § 2.3 комплементарные последовательности нуклеотидов являются частным примером комплементарных структур. На рис. 10 приведен пример таких структур без детализации конкретной химической природы отдельных групп. Из рисунка видно, что, например, наличие у одной из молекул положительно и отрицательно заряженных групп требует не просто наличия таких же групп у второй комплементарной молекулы, но и совершенно определенного их взаимного расположения. То же, естественно, касается и всех остальных взаимодействующих участков комплементарных партнеров.

Говоря о взаимном расположении некоторого набора атомов и радикалов в пределах одной молекулы, нужно учитывать, что подавляющее большинство органических молекул, встречающихся в живой природе, являются гибкими, т.е. могут существовать в виде большого числа конформаций. Изменение конформации, не изменяя природы каждого отдельного атома или радикала, может существенно повлиять на их взаимную ориентацию. Поэтому комплементарность присуща, строго говоря, не д ум молекулам вообще, а определен-

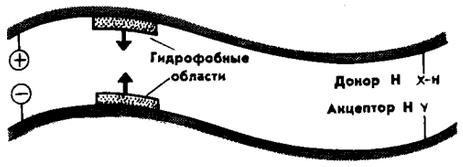


Рис. 10. Схема комплементарных структур

ным конформациям этих двух молекул. В результате этого по мере совершенствования опознаваемых и опознающих структур действуют две противоположные тенденции. С одной стороны, увеличение числа взаимодействующих точек способствует созданию все более уникальных структур, что приводит к повышению избирательности комплексообразования, т.е. более совершенному опознаванию. В то же время это требует участия более сложных структур, а это приводит к возрастанию числа возможных конформаций и, если благоприятная для процесса узнавания конформация не обладает какими-либо значительными преимуществами по сравнению с остальными конформациями той же молекулы, к уменьшению вероятности ее реализации, т.е. к уменьшению заселенности этого конформационного состояния молекулы.

Количественно это можно описать следующим образом. Образование комплекса между двумя партнерами характеризуется константой их ассоциации K_a:

$$K_a = [PL]/([P][L]) = K_{ист}\,\omega_1\omega_2.$$

Эта величина может быть представлена как произведение константы ассоциации $K_{ист}$ (истинная константа ассоциации), характеризующей взаимодействие молекул, находящихся в оптимальных конформациях, на заселенности этих конформаций в исходных молекулах ω_1 и ω_2. Селективное узнавание может иметь место лишь при достаточно высоких значениях K_a. Усложнение опознаваемых структур способствует повышению значения $K_{ист}$, но одновременно в общем случае должно приводить к уменьшению величин ω_1 и ω_2.

Поэтому для эффективного взаимодействия, обеспечивающего резко предпочтительное образование комплекса именно между данной парой молекул или фрагментов этих молекул, благоприятной является ситуация, при которой по крайней мере одна из взаимодействующих частиц имеет достаточно жесткую пространственную структуру, близкую к оптимальной для рассматриваемого взаимодействия. Это особенно важно в случае биополимеров, поскольку вследствие чрезвычайно высокого числа мыслимых конформаций у биополимеров переход из некоторой произвольной конформации в благоприятную для узнавания может потребовать абсурдно большого времени. По этой причине для узнавания биополимерами специфических партнеров необходимо наличие у них определенной пространственной структуры. Поскольку, как уже говорилось, выполнение белками их функций требует обычно в качестве первого этапа такого узнавания, пространственная структура белков имеет решающее значение для их функционирования.

Молекулярное узнавание является одним из наиболее фундаментальных свойств систем, с которыми имеют дело биохимики, и конкретные примеры комплементарных структур будут неоднократно приводиться в первую очередь при описании структуры нуклеиновых кислот и при рассмотрении механизма ферментативного катализа. Поэтому здесь приведен лишь один умозрительный пример структуры организованной для узнавания аминокислоты L-аспарагина. Эта аминокислота имеет несколько групп, которые могут участвовать во взаимодействии с узнающим ее белком,– заряженные амино- и карбоксильную группы и фрагмент $CONH_2$, способный одной своей частью выступать в качестве донора, а другой — в качестве акцептора протона при образовании водородных мостиков. Поэтому область узнавания аспарагина должна содержать набор групп во взаимном расположении, обеспечивающем комплементарность структуры (рис. 11) Нетрудно видеть, что приведенная комплементарная структура будет не только

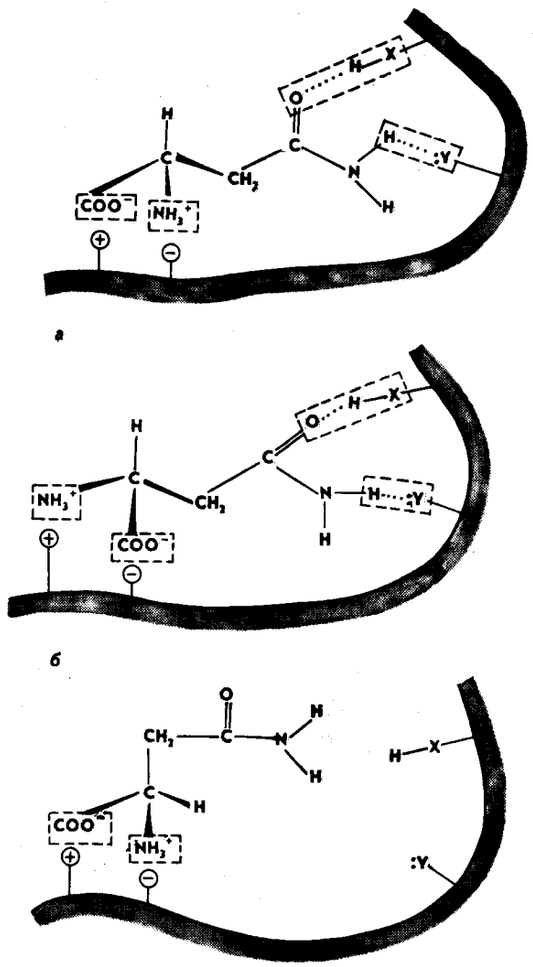


Рис. 11. Схема гипотетического узнавания молекулы аспарагина:

а – взаимодействие с L-изомером; *б* – взаимодействие амидного фрагмента D-изомера приводит к электростатическому отталкиванию двух других опознающих контактов; *в* – образование двух электростатических контактов D-изомера с опознающей структурой выводит амидный фрагмент из контакта с группами H-X и :Y

отличать аспарагин от других аминокислот, но и преимущественно взаимодействовать именно с L-изомером.

D-Изомер того же аспарагина, если он образует водородные связи с амидным фрагментом, не сможет образовать два электростатических контакта с опознающей структурой. Если же эти два контакта образуются, то амидная группа окажется направленной в сторону от участка, настроенного на образование двух водородных связей с амидным фрагментом. На этом примере видно, что трехточечное узнавание является достаточным для обеспечения стереоселективности взаимодействия, которое является характерной чертой подавляющего большинства биохимических процессов, протекающих с участием молекул, имеющих хиральные центры в районе опознаваемого фрагмента молекулы.

Образование комплекса биополимера со специфическим лигандом формально является бимолекулярным процессом. Так как речь идет о нековалентных взаимодействиях, то процесс не должен быть связан с преодолением существенного энергетического барьера и рассматриваемый в приближении бимолекулярной реакции является процессом, контролируемым диффузией. Однако такое рассмотрение, часто используемое для описания кинетики узнавания, является весьма упрощенным.

Во-первых, если даже речь идет о самом простом случае — узнавании белком низкомолекулярного лиганда, взаимодействие является в подавляющем большинстве случаев многоточечным, т.е. в конечном комплексе со стороны обоих участников взаимодействует по нескольку атомов или групп. Участок белковой молекулы, на котором расположены эти атомы и группы, обычно называют *активным центром*. Наряду с группами активного центра у белка всегда имеется большое число различных групп вне активного центра, способных к различным видам нековалентных взаимодействий и поэтому способных захватить молекулу лиганда, хотя значительно менее эффективно, чем это происходит в активном центре. Разумно предположить, что в ряде случаев такой захват приведет к тому, что лиганд, образовавший такой неспецифичный и несовершенный комплекс с молекулой белка, далее не покинет эту молекулу, а будет перемещаться вдоль ее поверхности, проходя через множество аналогичных несовершенных комплексов, до тех пор, пока не окажется в активном центре. Иными словами, поиск активного центра лигандом может происходить не методом проб и ошибок с полной диссоциацией случайно образовавшихся несовершенных комплексов, а путем своего рода двумерной диффузии захваченного в некотором случайном месте лиганда по поверхности белковой молекулы. Вопрос о возможности и преимуществах такого механизма узнавания пока изучен слабо как теоретически, так и экспериментально.

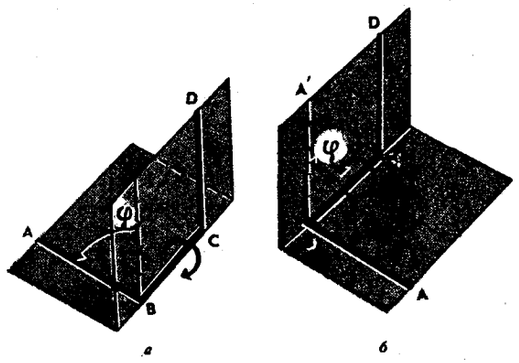
Несколько глубже продвинуто изучение узнавания специфического участка на линейных структурах. Речь идет об узнавании определенных участков в ДНК ферментом РНК-полимеразой. Синтез новых молекул РНК на ДНК-матрице должен начинаться в строго определенных точках. В связи с этим на двунитевых ДНК имеются специальные районы — *промоторы*, предшествующие участку начала транскрипции, с которыми РНК-полимеразы образуют весьма прочные комплексы (см. § 5.5). Экспериментально установлено, что сродством к ДНК-полимеразе обладают не только промоторы, но и все участки ДНК. По-видимому, первоначально РНК-полимераза может связаться с произвольным участком ДНК, однако эта связь недостаточна для начала синтеза новых молекул РНК. В то же время она обеспечивает возможность линейного перемещения фермента относительно ДНК до тех пор, пока фермент не достигнет промотора и не окажется прочно зафиксированным в положении, из которого при наличии необходимых мономеров он может начать сборку новой полирибонуклеотидной цепи. В последнее время получены экспериментальные доказательства такого процесса.

Кратковременное интенсивное УФ-облучение комплекса ДНК с РНК-полимеразой из *E. coli* приводит к ковалентному присоединению (сшиванию) фермента к ДНК. Если облучение провести практически одновременно со смешиванием ДНК и фермента, последний оказывается зафиксированным в самых разнообразных участках нуклеиновой кислоты, чаще всего вне промоторов. Если же перед облучением выждать некоторое достаточно продолжительное время, то сшивание происходит почти исключительно с промоторами. Таким образом, в этом случае действительно первоначально образуются случайные, мало специфичные и не очень прочные комплексы, а затем происходит одномерная (вдоль линейной структуры) диффузия фермента, приводящая в конечном итоге к попаданию его в нужный участок.

3.3. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Как известно, геометрия любой молекулы определяется тремя группами геометрических характеристик ее химических связей — длинами связей, валентными углами и *торсионными углами* между связями, примыкающими к соседним атомам. Первые две группы в решающей мере определяются природой участвующих атомов и образующихся связей. Поэтому пространственная структура полимеров в

основном определяется торсионными углами между звеньями полимерного остова молекул, т.е. конформацией полимерной цепи. Торсионный угол, т.е. угол поворота связи A—B вокруг связи B—C относительно связи C—D, определяется как угол между плоскостями, содержащими атомы A, B, C и атомы B, C, D (рис. 12).



а *б*

Рис. 12. Схема определения торсионных углов:

а – положительный угол; *б* – отрицательный угол

В принципе в системе атомов A, B, C и D возможна такая геометрия, при которой связи A—B и C—D расположены параллельно и находятся по одну сторону от связи B—C. Если проводить аналогию с системой, в которой связь между B и C двойная, то такую конформацию можно назвать *цис*-конформацией. Если рассматривать эту систему вдоль связи B—C, то связь A—B как бы заслоняет связь C—D, поэтому такая конформация называется заслоненной. Согласно рекомендациям международных союзов чистой и прикладной химии IUPAC* и биохимии IUB**, угол между плоскостями ABC и BCD считается положительным, если для приведения конформации в заслоненное состояние путем поворота на угол не выше 180° ближнюю к наблюдателю связь нужно поворачивать по часовой стрелке. Если эту связь для получения заслоненной конформации нужно поворачивать против часовой стрелки, то угол считается отрицательным. Нетрудно убедиться, что это определение не зависит от того, какая из связей находится ближе к наблюдателю.

Как уже указывалось в предыдущем параграфе, пептидная связь вследствие p,π-сопряжения π-связи карбонильной группы и p-орбитали атома N, на которой находится неподеленная пара электронов, не может рассматриваться как одинарная и вращение вокруг нее практически отсутствует. По этой же причине хиральный атом C^{α} и карбонильный атом $C^{к}$ любого i-го аминокислотного остатка пептидной цепи и атомы N и $C^{\alpha}(i+1)$-го остатка находятся в одной плоскости. В этой же плоскости, естественно, находятся карбонильный атом O и амидный атом

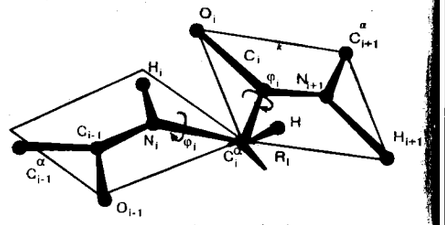
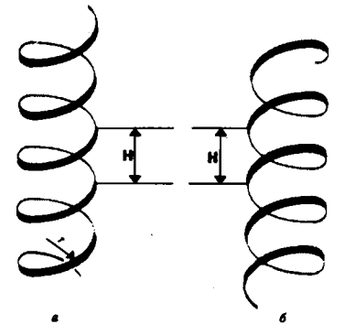


Рис. 13. Взаимное расположение в пространстве плоскостей двух соседних пептидных связей:

φ_i и ψ_i – торсионные углы, соответствующие поворотам вокруг связей $N_i - C^{\alpha}_i$ и $C^{\alpha}_i - C^{к}_i$

H* (рис. 13), расположенные по отношению друг к другу в *транс*-конфигурации. Поэтому геометрически полипептидную цепочку можно рассматривать как образованную такими плоскими фрагментами, содержащими каждый шесть атомов. Взаимное расположение этих фрагментов, как и всякое взаимное расположение двух плоскостей, должно определяться двумя углами. В качестве таковых принято брать торсионные углы, характеризующие вращения вокруг σ-связей $N—C^{\alpha}$ и $C^{\alpha}—C^{к}$. При этом, как видно из рис. 13, ориентация фрагмента, содержащего атомы C^{α}_{i-1} и C^{α}_i [$(i-1)$-й фрагмент], и фрагмента, содержащего атомы C^{α}_i и C^{α}_{i+1} (i-й фрагмент), определяется торсионными углами, соответствующими вращению вокруг связи $N_i—C^{\alpha}_i$ и связи $C^{\alpha}_i—C^{к}_i$. Эти углы принято обозначать как φ и ψ, в приведенном случае соответственно φ_i и ψ_i. Их значениями для всех мономерных фрагментов полипептидной цепи в основном определяется геометрия этой цепи. Никаких однозначных величин ни для значений каждого из этих углов, ни для их комбинаций не существует, хотя и на те и на другие накладывается ряд ограничений, определяемых как свойствами самих пептидных фрагментов, так и природой боковых радикалов, т.е. природой аминокислотных остатков.



а *б*

Рис. 14. Схематическое изображение спирали:

а – правая; *б* – левая; H – шаг спирали; *r* – радиус спирали

Если на протяжении некоторого участка цепи однотипные углы приблизительно одинаковы, то структура полипептидной цепи приобретает периодический характер. Существует два класса таких структур — спиральные и растянутые (плоские или складчатые).

Спиральной считается структура, у которой все однотипные атомы лежат на одной винтовой линии. При этом спираль считается правой, если при наблюдении вдоль оси спирали она удаляется от наблюдателя по часовой стрелке, и левой, если она удаляется против часовой стрелки. Нетрудно убедиться, что это определение не зависит от того, с какой стороны ее рассматривать (рис. 14). Полипептидная цепь имеет спиральную конформацию, если все атомы C^{α} находятся на одной винтовой линии, все карбонильные атомы $C^{к}$ — на другой, все атомы N — на третьей, причем шаг спирали для всех трех групп атомов должен быть одинаков. Одинаковым должно быть и число атомов, приходящихся на один виток спирали, независимо от того, идет ли речь об атомах $C^{к}$, C^{α} или N.

*International Union of Pure and Applied Chemistry.

**International Union of Biochemistry.

* Накопленный при изучении структуры белков материал показывает, что это утверждение не совсем строго. Атомы, связанные с пептидным атомом азота, находятся не в одной плоскости с ним, а образуют трехгранную пирамиду с углами между связями, очень близкими к 120°. Поэтому между плоскостями, образованными атомами C^{α}_i, $C^{к}_i$, O_i и N_{i+1}, H_{i+1}, C^{α}_{i+1}, существует некоторый угол, отличающийся от 0°. Однако, как правило, он не превышает 1° и при дальнейшем рассмотрении это отклонение учитываться не будет.

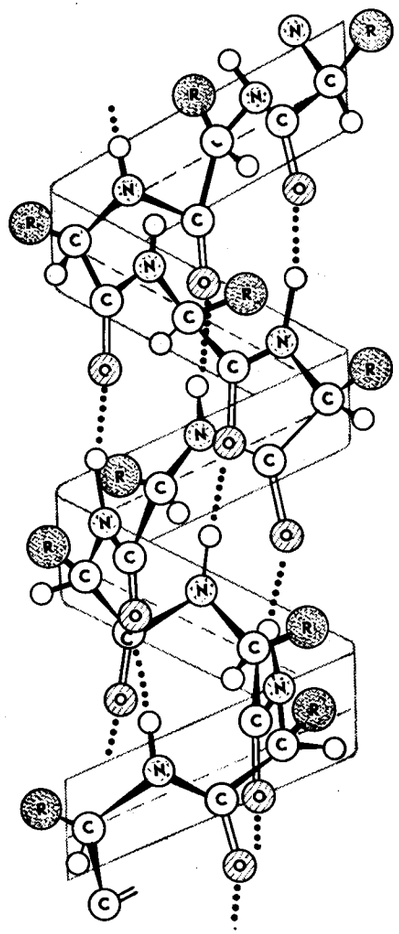


Рис. 15 Фрагмент α-спирали полипептидной цепи. Прерывистая линия изображает винтовую линию, проходящую через α-углеродные атомы

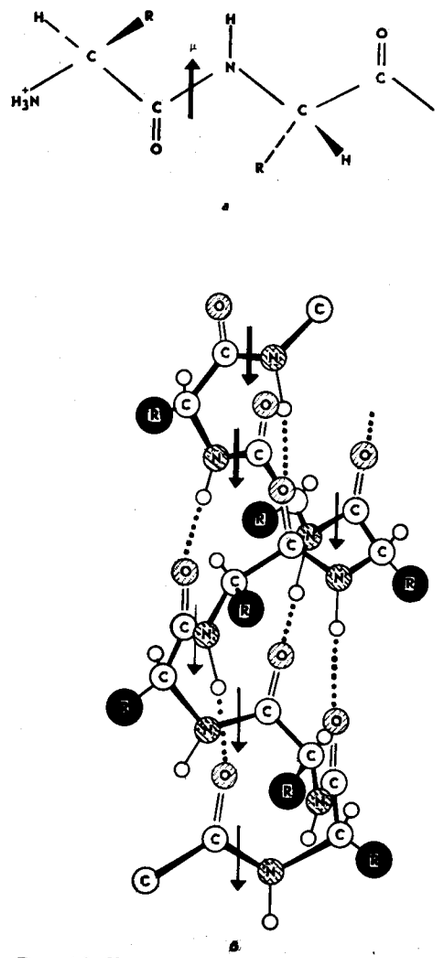


Рис. 16. Направление дипольных моментов (μ) пептидной связи:

а – дипептидного фрагмента; *б* – α-спирали

Расстояние же до общей оси винтовой линии для каждого из этих трех типов атомов свое.

Для полипептидных цепей известно несколько различных типов спиралей. Среди них наиболее распространена правая *α-спираль*, представленная на рис. 15. Идеальная α-спираль имеет шаг 0,54 нм и число однотипных атомов на один виток спирали 3,6, что означает полную периодичность на пяти витках спирали через каждые 18 аминокислотных остатков. Значения торсионных углов для идеальной α-спирали $\varphi = -57°$ и $\psi = -47°$, а расстояния от атомов, образующих полипептидную цепь, до оси спирали составляет для N 0,15 нм, для C^{α} 0,23 нм, для $C^{к}$ 0,17 нм. Естественно, что любая конформация, в том числе и спиральная, может преобладать в структуре биополимера только при условии, что имеются факторы, стабилизирующие эту конформацию. В случае α-спирали такими факторами являются водородные связи, образуемые каждым карбонильным атомом кислорода i-го фрагмента и амидным атомом $(i + 4)$-го фрагмента. Интересно отметить, что такая структура, нашедшая подтверждение на огромном накопленном в настоящее время материале по структуре белков, была первоначально предсказана теоретически в 1951 г. Полингом и Кори, которые исходили из данных по геометрии аминокислотных остатков и амидных связей и из общего соображения, что устойчивая структура должна содержать максимально возможное число водородных связей. Важное значение для стабилизации α-спирали имеет и то обстоятельство, что при этом оказываются параллельно ориентированы дипольные моменты пептидных связей, направление которых показано на рис. 16.

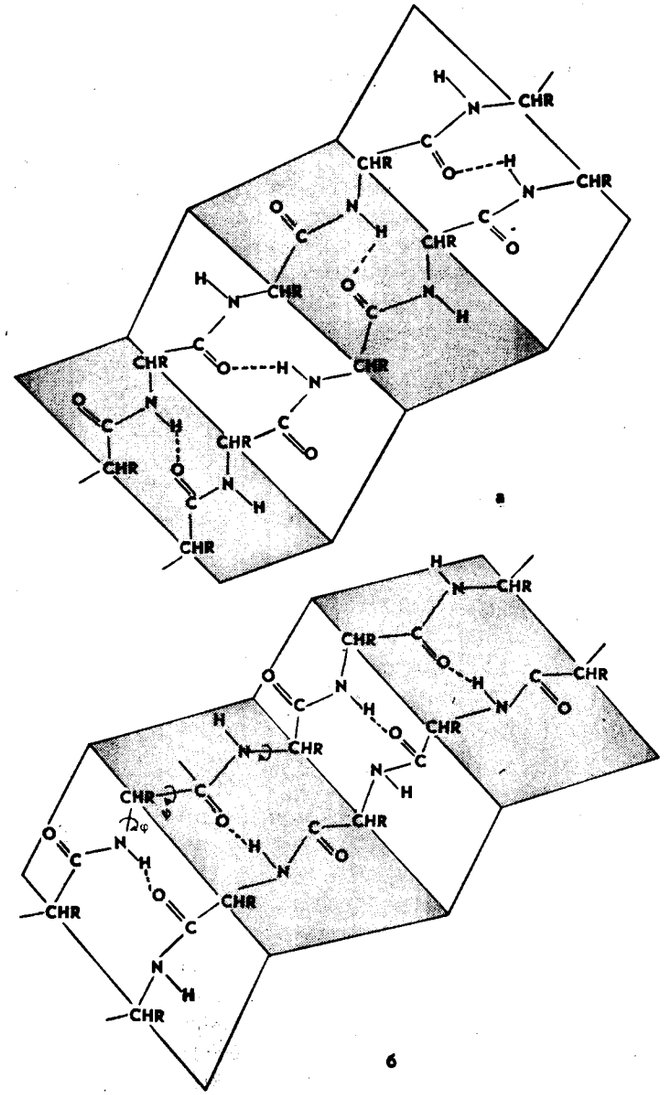


Рис. 17. Конформация β-складчатой структуры:

а – параллельная ориентация; *б* – антипараллельная ориентация

Следует иметь в виду, что на точные параметры α-спирали, как и любой другой периодической конформации, оказывает влияние природа связанных с пептидным остовом боковых радикалов. В качестве иллюстрации в табл. 3.5 приведены параметры α-спирали белка-фермента *фосфоглицераткиназы*, катализирующего одну из стадий превращения глюкозы в пируват — перенос остатка

фосфорной кислоты от АТФ на карбоксильную группу 3-фосфоглицерата (см. § 8.2). Видно, что все параметры, характеризующие этот регулярный участок цепи в известных, не очень больших пределах, колеблются около средних значений, характерных для идеальной спирали.

Важнейшим примером растянутой периодической структуры в белках является так называемые *β-складки*.

В первом приближении можно рассматривать β-складки как плоские структуры (рис. 17). Стабилизируются они в первую очередь водородными связями, образованными между двумя такими фрагментами карбонильными атомами кислорода одного и амидным атомом азота второго фрагмента. При этом взаимодействующие фрагменты могут, как видно из рис. 17, иметь либо параллельную, либо антипараллельную ориентации. При этом плоские пептидные фрагменты образуют не единую плоскую, а гофрированную структуру. Это сказывается и на значениях торсионных углов φ и ψ. Если в плоской, полностью растянутой структуре они должны были бы составить 180°, то в реальных β-слоях они имеют значения порядка $\varphi = -120°$ и $\psi = +110°$. Для того чтобы два участка полипептидной цепи расположились в ориентации, благоприятствующей стабилизации β-складок, между ними должен существовать участок, имеющий структуру, достаточно резко отличающуюся от периодической. Структуры, необходимые для того, чтобы пептидная цепь «замкнулась» сама на себя с образованием антипараллельной β-складки, называют *β-изгибами*. Как и в случае α-спирали, приведенные для β-слоев значения торсионных углов φ и ψ являются средними и в реальных полипептидных цепях варьируют в определенных не очень узких пределах, что также можно видеть в табл. 3.5.

Таблица 3.5. Некоторые параметры фрагмента полипептидной цепи фосфоглицераткиназы

Аминокислота		φ, град	ψ, град	$C^{\alpha}_{i} - C^{\alpha}_{i+1}$, нм	Расстояние от оси спирали до атомов			Вторичная структура
символика	номер				N	C^{α}	$C^{к}$	
Ile	254	−119,5	142,3	0,3817				
Phe	255	−106,6	−115,1	0,3810				
Acn	256	−109,2	113,7	0,3794				
Lys	257	−52,7	−51,6	0,3826	0,155	0,210	0,170	
Ala	258	−63,8	−48,9	0,3787	0,141	0,217	0,147	
Val	259	−51,1	−28,5	0,3745	0,142	0,217	0,165	
Gly	260	−59,9	−56,8	0,3853	0,126	0,213	0,154	
Pro	261	−62,9	−51,1	0,3742	0,156	0,229	0,172	
Glu	262	−57,7	−48,5	0,3810	0,159	0,234	0,173	
Ile	263	−60,5	−50,7	0,3808	0,155	0,227	0,170	
Ala	264	−57,9	−46,8	0,3782	0,168	0,236	0,162	
Lys	265	−61,4	−55,3	0,3816	0,163	0,210	0,155	α-Спираль
Leu	266	−60,0	−43,4	0,3714	0,141	0,224	0,161	
Met	267	−53,3	−46,0	0,3818	0,145	0,217	0,155	
Glu	268	−57,9	−50,1	0,3783	0,141	0,210	0,165	
Lys	269	−53,4	−42,5	0,3738	0,142	0,228	0,164	
Ala	270	−53,9	−46,8	0,3815	0,157	0,227	0,167	
Lys	271	−57,4	−50,1	0,3800	0,152	0,230	0,166	
Ala	272	−61,1	−50,9	0,3815	0,154	0,227	0,179	
Lys	273	−59,8	−47,6	0,3834				
Gly	274	−129,4	−86,1	0,3781				
Val	275	178,8	−66,1	0,3856				

Продолжение табл. 3.5.

Аминокислота		φ, град	ψ, град	$C^{\alpha}_{i} - C^{\alpha}_{i+1}$, нм	Расстояние от оси спирали до атомов			Вторичная структура
символика	номер				N	C^{α}	$C^{к}$	
Glu	276	−123,2	130,2	0,3776				
Val	277	−112,4	123,5	0,3831				β-Слой
Val	278	−109,9	117,7	0,3777				
Leu	279	−107	−177,5	0,3881				
Pro	280	−61,0	−111,6	0,3870				
Val	281	109,8	−27,7	0,3764				
Asp	282	−133,8	125,3	0,3716				
Phe	283	−142,6	154,6	0,3709				β-Слой
Ile	284	−124,8	132,7	0,3802				
Ile	285	−137,6	144,0	0,3800				
Ala	286	−135,0	139,8	0,3822				
Asp	287	−8,2	−91,3	0,3887				
Ala	288	−81,0	−174,3	0,3888				
Phe	289	−80,3	−31,8	0,3784				
Ser	290	−51,1	−147,6	0,3809				

Фрагменты пространственной структуры биополимера, имеющие периодическое строение полимерного остова, рассматривают как элементы *вторичной структуры* биополимера. Из сказанного выше следует, что главными элементами вторичной структуры белков являются α-спирали и β-складки.

Какую именно конформацию примет тот или иной участок полипептидной цепи в белковой молекуле, существенно зависит от структуры молекулы в целом. Факторы, влияющие на формирование участков с определенной вторичной структурой, весьма многообразны и далеко не во всех случаях полностью выявлены. Огромный материал, накопленный по пространственной структуре белков, пока-

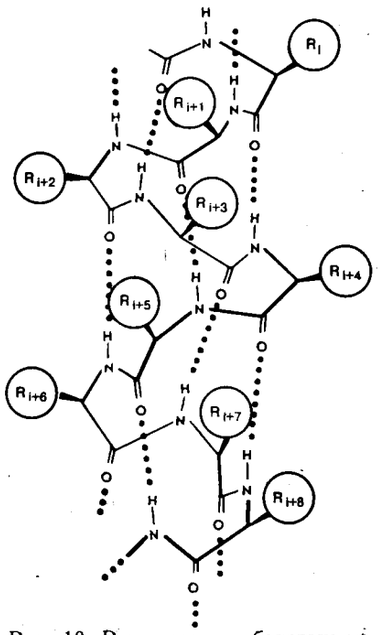


Рис. 18. Расположение боковых радикалов аминокислот (R_{i+n}) на витке α-спирали

зывает, что ряд аминокислотных остатков предпочтительно встречается в α-спиральных фрагментах, ряд других — в β-складках, некоторые аминокислоты — преимущественно в участках, лишенных периодической структуры. Скопление на некотором участке полипептидной цепи остатков, благоприятствующих образованию α-спирали, дает с большим основанием предполагать, что на этом участке полипептидная цепь действительно спирализована. Сказанное означает, что вторичная структура в значительной мере определяется первичной структурой, т.е. последовательностью аминокислотных остатков. В некоторых случаях физический смысл такой зависимости может быть понят из стереохимического анализа пространственной структуры. Например, как видно из рис. 18, в α-спирали сближены не только боковые радикалы соседних вдоль цепи аминокислотных остатков, но и некоторые пары остатков, находящихся на соседних витках спирали, в первую очередь каждый $(i+1)$-й остаток с $(i+4)$-м и с $(i+5)$-м. Поэтому в положениях $(i+1)$ и $(i+2)$, $(i+1)$ и $(i+4)$, $(i+1)$ и $(i+5)$ α-спиралей редко одновременно встречается два объемных радикала, таких, например, как боковые радикалы тирозина, триптофана, изолейцина. Еще менее совместимо со структурой спирали одновременное наличие трех объемных остатков в положениях $(i+1)$, $(i+2)$ и $(i+5)$ или $(i+1)$, $(i+4)$ и $(i+5)$. Поэтому такие комбинации аминокислот в α-спиральных фрагментах являются редким исключением, а появление таких комбинаций аминокислот в первичной структуре на участке, в целом склонном к свертыванию в α-спираль, свидетельствует, что в районе этих комбинаций α-спиральная конформация обрывается.

Высшим уровнем пространственной организации полипептидной цепи является ее *третичная структура*. Под этим термином понимают полную укладку в пространстве всей полипептидной цепи, включая укладку боковых радикалов. Полное представление о третичной структуре дают координаты всех атомов белка. Благодаря огромным успехам рентгеноструктурного анализа (см. § 7.13) такие данные, за исключением координат атомов водорода, имеются для значительного числа белков. Это огромные массивы информации, поскольку в каждом случае речь идет о координатах многих сотен и даже тысяч атомов. Эта информация хранится в специальных банках данных на машиночитаемых носителях, и ее обработка в большинстве случаев немыслима без помощи быстродействующих ЭВМ. Полученные на ЭВМ координаты атомов позволяют получать разнообразные сведения о геометрии белковых молекул, в том числе значения торсионных углов, и тем самым выявлять спиральные участки, β-складки и нерегулярные фрагменты цепи. Геометрические параметры участка фосфоглицераткиназы,

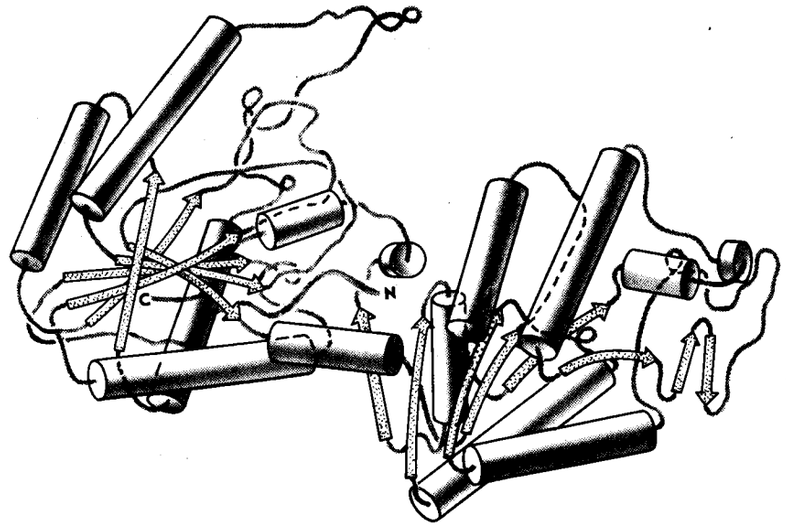


Рис. 19. Общая схема строения фосфоглицераткиназы. Для наглядности α-спиральные участки представлены в виде цилиндров; β-складки — в виде лент со стрелкой, указывающей направление цепи в складке от N-конца к С-концу; нерегулярные участки — в виде линий, соединяющих структурированные фрагменты

приведенные в табл. 3.5, являются результатом соответствующей обработки данных, взятых из банка пространственных структур для этого фермента.

Изображение полной структуры даже небольшой белковой молекулы на плоскости, будь то страница книги или экран дисплея, мало информативно вследствие чрезвычайной сложности объекта. Чтобы исследователь мог с достаточной степенью наглядности воспринимать геометрию белковой молекулы, используют методы компьютерной графики, которая позволяет выводить на экран дисплея отдельные части полной структуры и манипулировать с ними с помощью специальных программ, в частности поворачивать их в нужных ракурсах.

Для представления общего хода полипептидной цепи изображают три главных структурных элемента вторичной структуры (α-спирали, β-складки и нерегулярные участки) соответственно в виде столбиков, лент со стрелкой, указывающей направление цепи в складке от N-конца к С-концу, и в виде линий, соединяющих структурированные фрагменты. На рис. 19 в таком изображении представлена общая схема строения фосфоглицераткиназы.

Третичная структура формируется в результате нековалентных взаимодействий боковых радикалов, обрамляющих α-спирали и β-складки, и непериодических фрагментов полипептидной цепи. Для каждого белка как сама структура в целом, так и набор нековалентных взаимодействий, ее стабилизирующих, уникальны. Можно отметить лишь некоторые тенденции в построении этих структур. Так, белки, находящиеся в растворимой фракции клеток или секретируемые из клеток, как правило, построены таким образом, что гидрофобные радикалы сконцентрированы во внутренней части молекулы, а гидрофильные экспонированы наружу. Накопленные в последние годы пока еще не слишком многочисленные данные о пространственной структуре белков, функционирующих в мембра-

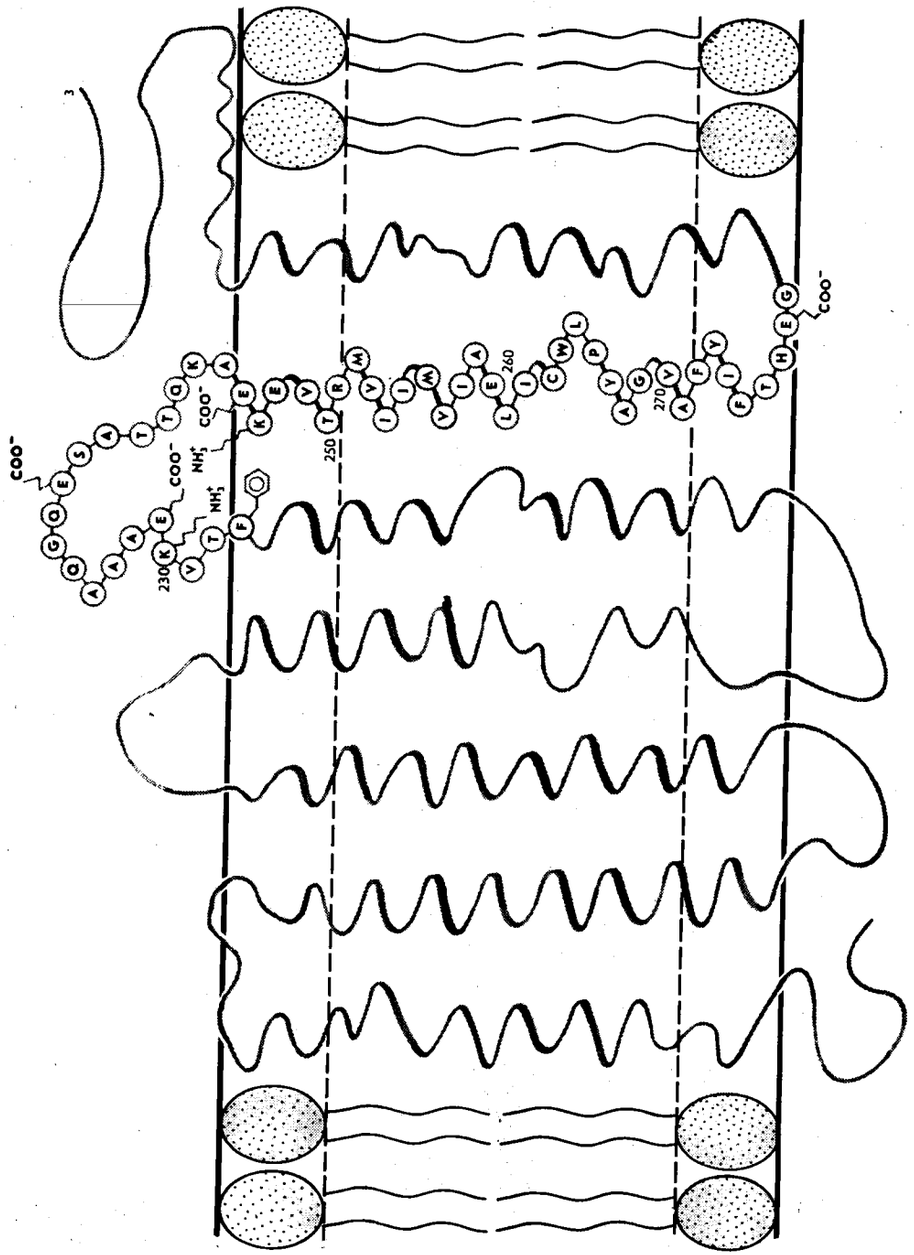


Рис. 20. Схема расположения в мембране [illegible]

нах, свидетельствуют, что гидрофобные фрагменты полипептидных цепей пронизывают бислойные фосфолипидные мембраны, а гидрофильные находятся снаружи мембраны. В качестве примера на рис. 20 показана общая схема расположения в мембране белка *родопсина** — зрительного пигмента, воспринимающего свет в сетчатке глаза. Как видно на примере одного из фрагментов, представленного в виде аминокислотной последовательности, более половины аминокислотных остатков погруженной в мембрану части полипептидной цепи представлены такими гидрофобными аминокислотами, как валин, изолейцин, пролин, метионин, фенилаланин и тирозин. В то же время в составе примыкающего к нему участка, выступающего из мембраны, ни одного подобного остатка вообще не встречается.

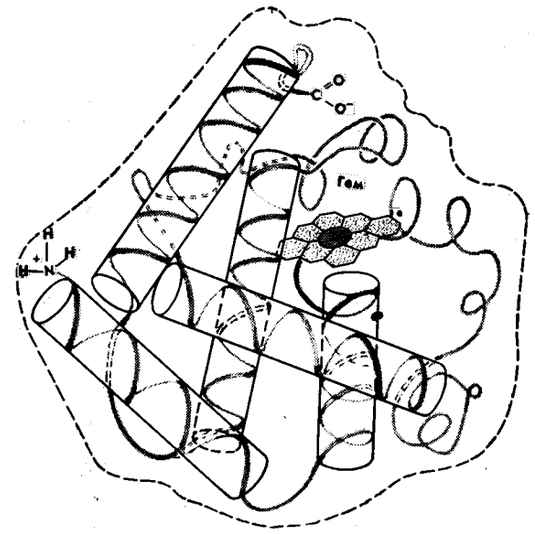
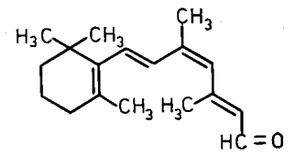


Рис. 21. Схема пространственной структуры миоглобина.

Пространственная структура большинства функционально активных белков довольно компактна и в первом грубом приближении может быть представлена в виде шара или не слишком вытянутого эллипсоида. Такие белки называют *глобулярными*. Как правило, значительная часть полипептидной цепи таких белков формирует α-спирали и β-складки. Соотношение между ними может быть самым различным. Например, у *миоглобина* — мышечного белка, способного аналогично гемоглобину связывать кислород, но состоящего из одной полипептидной цепи, несущей один остаток гема, имеется пять α-спиральных сегментов и нет ни одной β-складки (рис. 21). У иммуноглобулинов, наоборот, спиральные фрагменты отсутствуют и основными элементами вторичной структуры являются β-складки (рис. 22). В пространственной структуре фосфоглицераткиназы присутствуют приблизительно в равной мере оба типа периодических структур (см. рис. 19).

В некоторых случаях, как это, в частности, видно на той же схеме строения

*Родопсин является комплексом белка опсина и ретиналя:



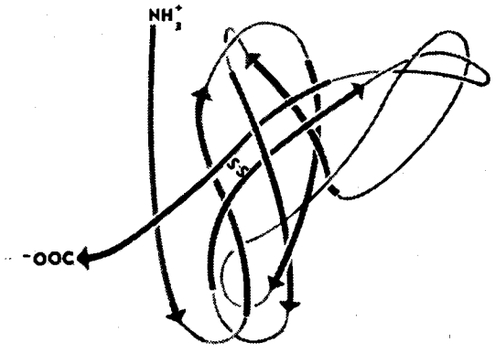


Рис. 22. Схема третичной структуры вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина G

фосфоглицераткиназы, отчетливо просматриваются две связанных пептидными мостиками и четко разделенных в пространстве области, каждая со своей третичной структурой. Такие достаточно автономные части белковой молекулы получили название *доменов*. В большом числе случаев разные активные центры белка разнесены по разным доменам. Например, в случае фосфоглицераткиназы на одном из доменов находится центр связывания АТФ, а на другом — центр связывания 3-фосфоглицерата.

Пространственная структура глобулярного белка должна в конечном итоге обеспечить формирование некоторого активного центра или нескольких таких центров, в каждом из которых участвует относительно небольшое число аминокислотных остатков.

Подавляющее большинство аминокислотных остатков имеет структурное значение, обеспечивая сближение радикалов, входящих в состав активного центра.

По-видимому, необходимая для этого пространственная структура может быть реализована большим числом способов. С этим связано то обстоятельство, что один и тот же в функциональном плане белок может быть представлен у разных видов живых организмов полипептидами, существенно отличающимися по своей первичной структуре. Это уже было продемонстрировано в табл. 2.2 на примере ряда панкреатических рибонуклеаз млекопитающих. Рассмотрение таблицы показывает, что, несмотря на все многообразие аминокислотных последовательностей, в их составе имеется большое число универсальных аминокислот, например Thr-45, His-12 и His-119. В § 6.1 при описании строения активного центра рибонуклеазы показано, что все эти три остатка непосредственно участвуют в специфическом взаимодействии фермента с субстратом.

Белки, выполняющие структурные функции, в отличие от глобулярных белков часто имеют вытянутую нитевидную форму, их называют в этом случае *фибриллярными белками*. Такие белки имеют в первичной структуре повторяющиеся мотивы и формируют достаточно однотипную для всей полипептидной цепи вторичную структуру. Так, белок *α-кератин*, основной белковый компонент копыт, ногтей, волос, шерсти, рогов, панцирей черепах, построен из протяженных α-спиралей. Фиброин шелка на большом протяжении представлен фрагментами Gly-Ala-Gly-Ser, образующими β-складки. Встречаются у фибриллярных белков и другие, менее распространенные элементы вторичной структуры. Например, полипептидные цепи коллагена, в значительной мере построенные из чередующихся фрагментов строения Gly-X-Pro или Gly-X-Hyp (Hyp — оксипролин), образуют левые спирали с параметрами, существенно отличающимися от параметров α-спирали. В коллагеновых волокнах три спиральные полипептидные цепи скручены в единую правую суперспираль (рис. 23).

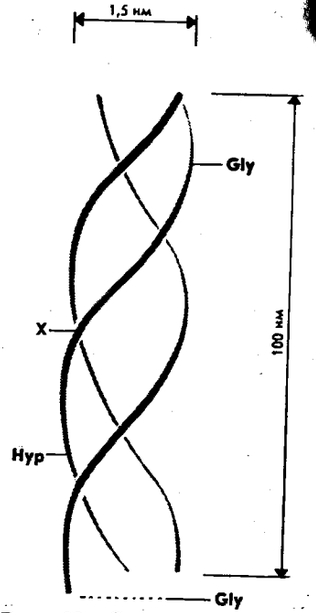


Рис. 23. Схема трехнитевой структуры фрагмента коллагенового волокна. Аминокислотная последовательность каждой цепи (- Pro - Gly - X - Pro - Gly - - X - Hyp - Gly - Pro - Hyp - Gly)$_n$ (Hyp – остаток гидроксипролина, X – остаток произвольной аминокислоты)

3.4. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

При установлении истинной конформации нуклеиновых кислот возникает три вопроса. Первый — это *конформация рибозофосфатного остова*, состоящего из периодически повторяющихся атомов P, O5′, C5′, C4′, C3′, O3′. Она описывается шестью торсионными углами α, β, γ, δ, ϵ, η, характеризующими повороты вокруг шести повторяющихся связей P—O5′, O5′—C5′, C5′—C4′, C4′—C3′, C3′—O3′ и O3′—P. Именно эти углы определяют общий ход полинуклеотидной цепи.

Второй — *конформация фуранозного цикла*. Система из пяти атомов помимо трех поступательных и трех вращательных имеет еще девять степеней свободы. Поэтому построить циклическую структуру с заданными длинами связей и углами между связями, т.е. с десятью заданными геометрическими параметрами, в общем случае нельзя. Пятичленные циклы, в том числе фуранозный, существуют в результате отклонений значений валентных углов от оптимальных, свойственных аналогичным линейным структурам. Вариации этих отклонений в определенных пределах допускают и вариации торсионных углов в цикле, в результате чего возможно существование нескольких конформаций. Качественно их принято характеризовать расположением атомов цикла относительно некоторой плоскости, характеризующей общую ориентацию цикла. При этом можно представить себе 10 идеализированных конформаций, при которых четыре атома из пяти находятся в одной плоскости, а пятый выступает из нее либо в ту же сторону, что и CH_2-группа (*эндо*-конформация), либо в противоположную (*экзо*-конформация). Такие конформации, имеющие форму конверта (от англ. envelope), называют *E*-конформациями. Все остальные мыслимые конформации таковы, что никакие четыре атома не находятся в одной плоскости. Их называют скрученными или твист-конформациями (сокращенно *T*-конформация).

Любой переход между *E*-конформациями можно представить себе как результат одного или нескольких перемещений, при каждом из которых пара соседних атомов постепенно изменяет свое положение относительно плоскости, образованной тремя остальными атомами фуранозного цикла. Суть перемещения заключается в том, что атом, выступающий из плоскости в исходной *E*-конформации, перемещается в направлении этой плоскости, а соседний атом синхронно перемещается в том же направлении от плоскости. Это перемещение заканчивается образованием новой *E*-конформации, причем в силу характера перемещения *экзо*-конформация переходит в *эндо*-, а *эндо*-конформация — в *экзо*. Такой переход получил название *псевдовращения*.

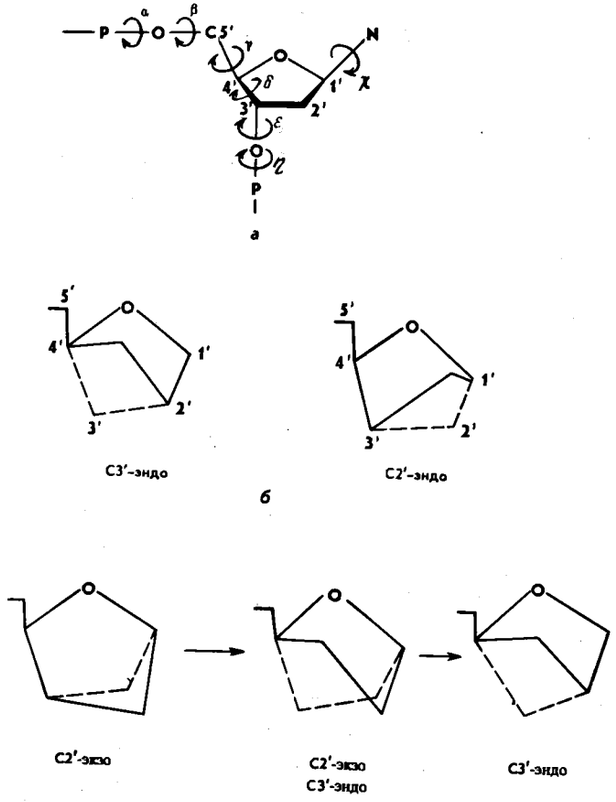


Рис. 24. Торсионные углы и конформации фуранозного цикла рибозы:

а – торсионные углы; *б* – Е-конформация (С3′-эндо и С2′-эндо); *в* – переход конформации С2′-экзо в С3′-эндо через промежуточную С2′-экзо, С3′-эндо (Т) конформацию

некоторый угол P, при изменении которого от 0 до 360° проходится весь набор конформаций. При этом значение 0° приписывается конформации, в которой атомы С3′ и С2′ в равной степени выступают из плоскости, образованной атомами С1′, С4′ и О4′, причем атом С3′ в ту же сторону, что и 5′-CH_2-группа, а атом С2′ — в противоположную. Такая конформация называется *С2′-экзо, С3′-эндо*. Она является промежуточной между *С2′-экзо*, которой приписывают P = 342°, и *С3′-эндо* с P = 18°. Дальнейшее увеличение угла P соответствует взаимному перемещению атомов С3′ и С4′, при чем через 36° достигается следующая *Е*-конформация, *С4′-экзо*. Последующее увеличение P связано со взаимным перемещением атомов С4′ и О4′ и т.д. В составе нуклеиновых кислот чаще всего встречаются *С2′-эндо* и *С3′-эндо* конформации, которым соответствуют значения угла псевдовращения 162 и 18°. На рис. 24 приведены эти две конформации, а также переход конформации *С2′-экзо* в *С3′-эндо*, через промежуточную *С2-экзо, С3′-эндо*-конформацию.

Третий вопрос — *взаимная ориентация фуранозного цикла и азотсодержащего гетероцикла*, определяемая торсионным углом, описывающим поворот относительно гликозидной связи. Этот угол, обозначаемый χ, определяется как угол для системы атомов О4′ — С1′ — N1 — С2 (рис. 25) у пиримидиновых и О4′ — С1′ — N9 — С4 у пуриновых нуклеотидов. Для качественного рассмотрения можно в грубом приближении представить себе, что средняя плоскость фуранозного цикла и плоскость гетероцикла взаимно перпендикулярны. Торсионный угол χ определяет, какая часть гетероцикла оказывается над плоскостью фуранозного кольца, а какая повернута в сторону от кольца. Две стороны гетероциклов как у пуринов, так и у пиримидинов не эквивалентны. Наиболее близкими к плоскости, характеризующей расположение фуранозного цикла, в случае пиримидиновых гетероциклов тимина, урацила и цитозина являются группа С6 — Н6 и существенно более объемная и к тому же полярная группа С2 — О2. В случае пуриновых гетероциклов — аденина и гуанина — ближайшими к той же плоскости оказываются группа С8 — Н8 и существенно более объемистый фрагмент С4 — N3 — С2 (рис. 25). Конформации, при которых более объемистый фрагмент повернут в направлении от фуранозного кольца, называют *анти-конформациями*. Им соответствует диапазон значений χ от −70° до −180°. В большинстве случаев для перечисленных гетероциклов как в составе нуклеозидов и нуклеотидов, так и в составе нуклеиновых кислот *анти*-конформации являются предпочтительными. В противоположной ситуации, когда над фуранозным кольцом располагается фрагмент С2 — О2 пиримидина или шестичленный цикл пуриновой системы, конформации называются *син-конформациями*. Им соответствуют углы χ от 0 до 110°.

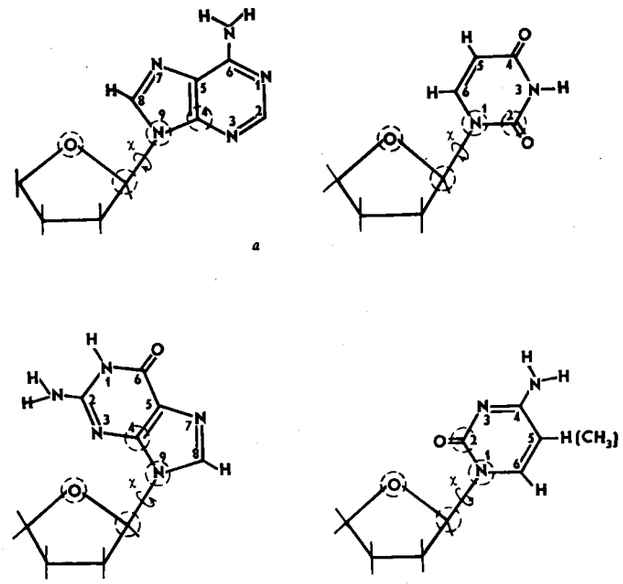


Рис. 25. Конформации гетероцикла относительно фуранозного кольца рибозы:

а – *анти*– и *б* – *син*-конформации.

Атомы, определяющие взаимную ориентацию фуранозного цикла и азотсодержащего гетероцикла, выделены

Предпочтительность *анти*-конформации не является абсолютной. В § 3.7 описаны случаи, когда в нуклеиновых кислотах гуанозин находится в *син*-конформации. Кроме того, последняя оказывается предпочтительной у модифицированных оснований, если в положение 6 пиримидина или положение 8 пурина вводятся объемистые заместители, например метильная группа или атом брома.

Сама полинуклеотидная цепь не имеет какой-либо резко предпочтительной конформации, поскольку между ее атомами не существует таких специфичных взаимодействий, как в полипептидной цепи в *α*-спирали или в *β*-слоях. Определяющее значение для ее конформации имеют взаимодействия гетероциклических

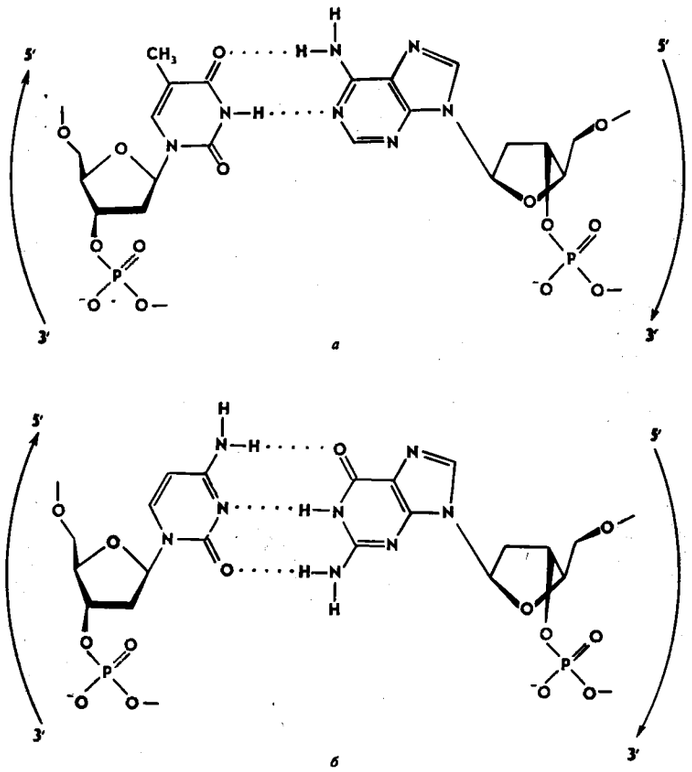


Рис. 26. Уотсон-криковское взаимодействие между гетероциклами, входящими в состав полинуклеотидных цепей:

а – тимин–аденин; *б* – цитозин–гуанин

фрагментов. Они могут быть весьма многообразны, однако среди них резко выделяются взаимодействия, которые называют уотсон-криковскими по имени установивших их авторов, — это взаимодействия между тимином или урацилом и аденином и между гуанином и цитозином. Эти взаимодействия реализуются, если две полинуклеотидные цепи или два фрагмента одной цепи антипараллельны, причем рибозофосфатные остовы каждой из цепей или каждого из фрагментов образуют правую спираль, ось которой проходит приблизительно перпендикулярно плоскости, в которой находятся взаимодействующие гетероциклы.

Схемы взаимодействия между гетероциклами вместе с примыкающими к ним участками рибозофосфатных остовов приведены на рис. 26. Важным свойством именно этих пар гетероциклов и именно приведенной их взаимной ориентации является идентичность размеров этих пар и их ориентации относительно связанных с ними атомов C1′, а тем самым и относительно всей периодической части остова. Поэтому последовательность чередования гетероциклов, т.е. последовательность нуклеотидов в одной из цепей или в одном из взаимодействующих фрагментов цепи, может быть произвольной. Вторая же последовательность однозначно ей соответствует.



Рис. 27. Схема самоудвоения ДНК

Первичным носителем наследственной информации у всех живых организмов является ДНК. Именно ДНК обладает способностью к самокопированию, которое необходимо, чтобы снабдить программами обе дочерние клетки, образующиеся при делении материнской клетки. Детальный механизм самокопирования ДНК рассмотрен в § 5.1 и 5.4. Здесь же вкратце описывается принцип построения этих молекул, обеспечивающий их способность к самокопированию.

ДНК хромосом состоит из двух полинуклеотидных цепей, свернутых вместе в единую спиральную структуру так, что все нуклеотидные остатки двух цепей попарно сближены. При этом каждая такая пара нуклеотидов содержит в качестве гетероциклов либо аденин и тимин, либо гуанин и цитозин. Это означает, что каждая пара образована одним пуриновым и одним пиримидиновым нуклеотидами. Полинуклеотидные цепи в этой структуре, называемой часто *двойной спиралью*, расположены антипараллельно, т.е. при наблюдении этих цепей вдоль спирали одна оказывается направленной от 5′-конца к 3′-концу, а другая — от 3′-конца к 5′-концу. Две нуклеотидные последовательности, у которых при антипараллельном расположении попарно сближенными оказываются остатки тимина и аденина или остатки цитозина и гуанина, называют *комплементарными*.

Очевидно, что любой цепи ДНК с произвольной последовательностью нуклеотидов соответствует одна и только одна комплементарная последовательность. Именно это и создает предпосылки для самоудвоения ДНК любой произвольной структуры. При синтезе новых полидезоксирибонуклеотидных цепей две цепи ДНК материнской клетки расходятся и на каждой из них строится новая, комплементарная ей цепь, идентичная отделившейся материнской цепи. Схематично для некоторого фрагмента двуцепочечной (двунитевой) ДНК определенной структуры процесс самоудвоения представлен на рис. 27. Более того, такая двунитевая структура является основой для сохранения информации, заложенной в ДНК, в случае повреждения одной из нитей. Специальные системы восстановления повреждений (репарации) в случае неблагоприятного воздействия на одну из цепей какого-либо химического реагента, ультрафиолетового или ионизирующего излучения вырезают поврежденный участок, а образовавшаяся брешь застраивается новыми неповрежденными нуклеотидными фрагментами по информации, содержащейся в комплементарном участке сохранившейся цепи.

Как уже отмечалось в начале параграфа, главным содержанием наследственной информации являются сведения о структуре белков, т.е. полипептидных цепей, присущих данному организму. Эта информация содержится в молекулах ДНК, однако последние не принимают непосредственного участия в управлении синтезом белков. Управление осуществляется с помощью специальных посредников (мессенджеров), в роли которых выступают РНК-мессенджеры (мРНК), известные также как *информационные РНК*. Синтез белков происходит на сложных надмолекулярных структурах — *рибосомах*, которые построены из нескольких молекул специальных *рибосомных РНК* (три у прокариот, четыре у эукариот) и

нескольких десятков белков. Аминокислоты для сборки новых полипептидных цепей поступают к рибосомам в виде, связанном с уже упоминавшимися транспортными РНК, причем каждый вид тРНК в живых клетках и в выделенных из живых организмов ферментных системах связывает одну определенную аминокислоту. мРНК привносит в рибосомы информацию, в каком порядке следует отбирать тРНК, а вместе с ними и аминокислоты для последовательного наращивания полипептидной цепи. Эта информация записана в мРНК с помощью специального *генетического кода*, который приводит в соответствие линейную последовательность нуклеотидов мРНК с линейной последовательностью аминокислот в запрограммированной полипептидной цепи. Вопрос о генетическом коде подробно рассматривается в § 5.2. Основной принцип этого кода состоит в том, что каждой аминокислоте соответствует одна или несколько комбинаций из трех нуклеотидов — тринуклеотид, который и является кодирующим элементом и называется *кодоном*. Например, фенилаланин кодируется тринуклеотидами U—U—U и U—U—C, глицин — тринуклеотидами G—G—U, G—G—C, G—G—A, G—G—G, метионин — тринуклеотидом A—U—G. Информация, записанная в виде последовательности нуклеотидов, или, точнее, в виде последовательности кодонов, переводится на рибосомах в последовательность аминокислот, и поэтому процесс в целом называется *трансляцией*.

ДНК, в свою очередь, непосредственно управляет синтезом рибонуклеиновых кислот — информационных, транспортных, рибосомных. Молекулы РНК и их фрагменты также способны к взаимодействиям с комплементарными последовательностями ДНК с той лишь разницей, что аденину в этом случае соответствует урацил. С помощью специального фермента — *РНК-полимеразы* — на соответствующих участках ДНК из рибонуклеотидов формируется новая молекула РНК с последовательностью мономеров, комплементарной одной из нитей ДНК. Информация, содержащаяся в этой нити, как бы переписывается в виде однозначно ей соответствующей комплементарной последовательности рибонуклеотидов, в связи с чем процесс называют *транскрипцией*.

Из рис. 27 видно, что остовы должны быть ориентированы навстречу друг другу, чтобы обеспечить должное направление взаимодействующих гетероциклов. Видно также, что нуклеотидные фрагменты должны находиться в *анти*-конформации. Наличие метильной группы в пиримидиновом гетероцикле у тимина не играет существенной роли во взаимодействии, и поэтому урацил, лишенный этой группы, ведет себя при комплементарных взаимодействиях аналогично тимину.

Специфичность взаимодействия между комплементарными фрагментами цепей или протяженными цепями обеспечивается образованием водородных связей. Однако в энергетику взаимодействия, обеспечивающую в конечном счете образование таких двуспиральных структур, столь же весомый вклад вносят стекинг-взаимодействия между соседними парами гетероциклов.

Поскольку рассмотренные взаимодействия приводят к периодической структуре рибозофосфатного остова, то двуспиральные конформации рассматриваются как элементы вторичной структуры нуклеиновых кислот.

В пределах одной полинуклеотидной цепи наличие комплементарных последовательностей приводит чаще всего к образованию так называемых *шпилек*, состоящих из двуспирального *стебля*, образованного этими последовательностями

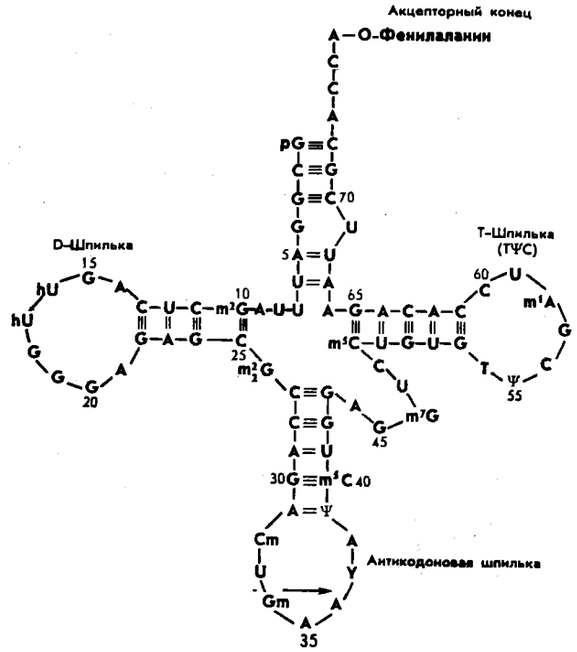


Рис. 28. Структура клеверного листа фенилаланиновой тРНК:

m^2G — 2-N-метилгуанозин; hU — дигидроуридин; m^2_2G — 2,2-диметилгуанозин; Cm — 2′-O-метилцитидин; Cm — 2′-O-метилгуанозин; m^5C — 5-метилцитидин; m^7G — 7-метилгуанозин; ψ — псевдоуридин; m^1A — 1-N-метиладенозин; Y — вайбутозин

структуры наиболее характерны для рибонуклеиновых кислот, поскольку ДНК преимущественно существует в виде комплекса, образованного двумя комплементарными, не связанными между собой ковалентно полинуклеотидными цепями.

Вопрос о пространственной структуре одноцепочечных рибонуклеиновых кислот наиболее подробно изучен для транспортных рибонуклеиновых кислот (тРНК). Установление первичной структуры большого числа транспортных РНК показало, что все они построены таким образом, что у них имеется три пары комплементарных фрагментов, разделенных участками в несколько нуклеотидных остатков, не имеющих партнеров для образования сколько-нибудь протяженных комплементарных участков. Кроме того, начало полинуклеотидной цепи (5′-концевая часть) комплементарно последовательности, непосредственно примыкающей к противоположному концу цепи, на котором находится универсальный для всех тРНК тринуклеотид pCpCpA. Это дало основание приписать всем тРНК вторичную структуру, получившую название клеверного листа (рис. 28). Концевые комплементарные фрагменты образуют стебель, получивший название акцепторного, так как он имеет уже упомянутый тринуклеотид, к которому и присоединяется специфичная для данной тРНК аминокислота (см. § 5.6). Кроме того, в структуре имеется три шпильки:

D-шпилька — в ней обычно располагается минорный нуклеозид дигидроурид-

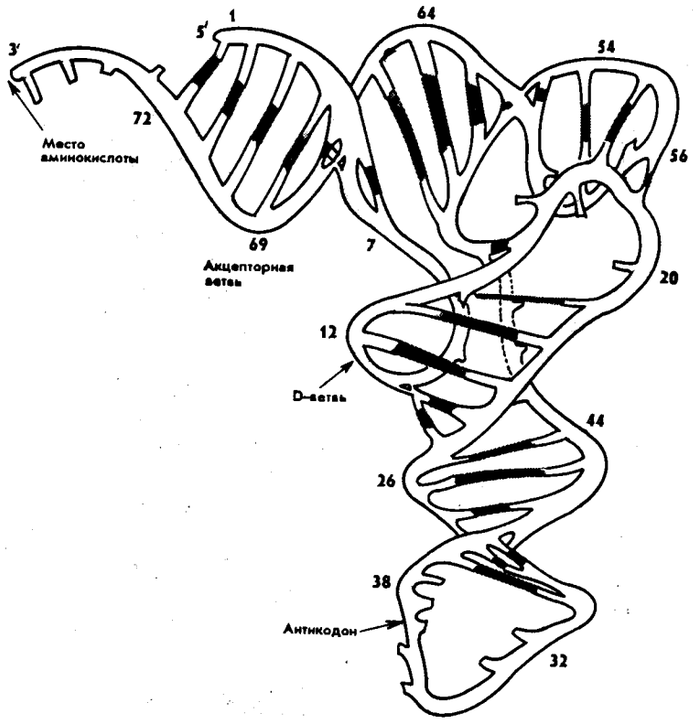


Рис. 29. Пространственная структура тРНК^{Phe} (структура Рича)

антикодоновая шпилька — в ее петлевой части находится тринуклеотид, называемый *антикодоном*, который в ходе биосинтеза белка на рибосомах непосредственно взаимодействует с кодоном мРНК, подлежащей трансляции;

Т-шпилька — в ней в подавляющем большинстве тРНК находится метилированный в положении 5 остаток уридина, т.е. рибоаналог тимидина.

Размеры каждого из стеблей и каждой из петель практически универсальны для всех тРНК независимо от того, каким аминокислотам они соответствуют и из каких биологических источников выделены, хотя известны и отдельные резко выпадающие исключения.

Рентгеноструктурный анализ (см. § 7.13), проведенный двумя группами ученых в США (Рич) и Англии (Клуг) для специфичной к фенилаланину тРНК из дрожжей, полностью подтвердил существование этих шпилек и стеблей, но одновременно показал, что вследствие некоторых дополнительных взаимодействий они сложены в L-образную структуру (рис. 29).

Сходная пространственная структура была позднее найдена для некоторых других тРНК. Многочисленные данные указывают, что в общих чертах такая структура является универсальной для всех тРНК. Пока эти L-образные структуры являются единственными достоверно установленными третичными структурами нуклеиновых кислот.

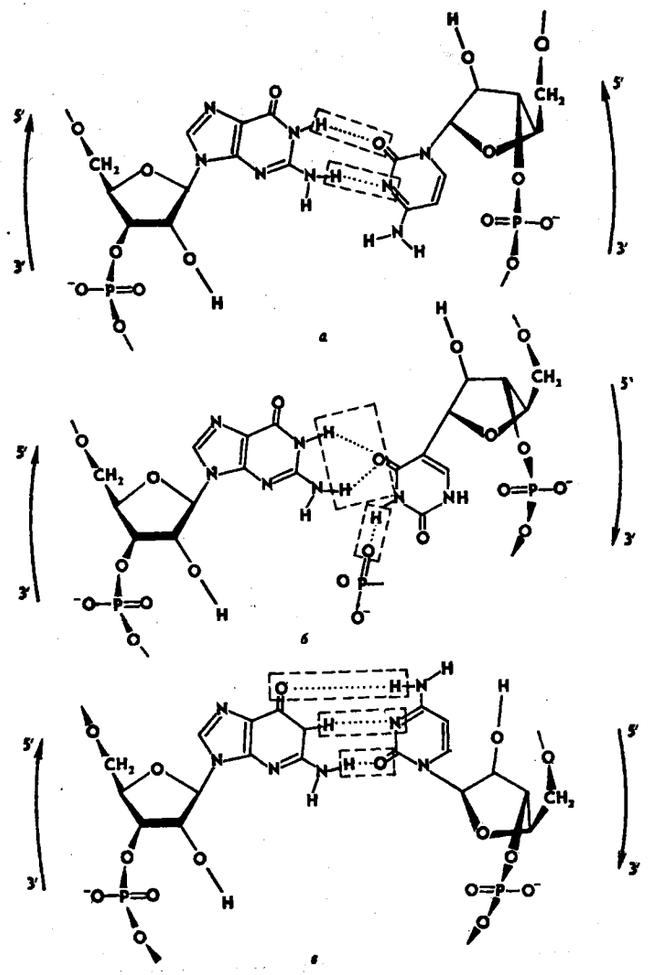


Рис. 30. Схема взаимодействия гетероциклов Т- и D-шпилек, стабилизирующих третичную структуру тРНК:

а – гуанин 15–цитозин 48; *б* – гуанин 18–псевдоуридин 55–фосфат 58; *в* – гуанин 19–цитозин 56 (стрелки указывают направление вращения спирали)

Важнейшими среди взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру тРНК, являются в первую очередь стекинг пар оснований в акцепторном и Т-стеблях и в антикодоновом и D-стеблях, в результате чего четыре коротких двуспиральных фрагмента складываются в два более протяженных. Кроме того, имеется существенное взаимодействие между гетероциклами Т- и D-шпилек, а именно между гуанином в положении 15 D-петли и цитозином 48 в основании Т-стебля, гуанином 18 D-петли и урацилом псевдоуридина 55 Т-петли, гуанином 19 D-петли и цитозином 56 Т-петли (рис. 30). Видно, что только последнее из перечисленных трех взаимодействий является уотсон-криковским. Для образования

третичной структуры этот тип взаимодействий между гетероциклами никаких явных преимуществ по сравнению с другими мыслимыми взаимодействиями не имеет, так как не требуется образования периодической структуры остова.

3.5. САМООРГАНИЗАЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Белки и нуклеиновые кислоты в живых организмах образуются путем последовательного наращивания полимерной цепи мономерными звеньями, порядок присоединения которых определяется программирующими биосинтез нуклеиновыми кислотами. Однако последние сами по себе определяют лишь первичную структуру создаваемого биополимера. Для того чтобы биополимер принял необходимую для его функционирования пространственную структуру (нативную структуру), необходимо, чтобы последняя была запрограммирована самой первичной структурой белка. Случайное образование даже термодинамически наиболее выгодной, т.е. наиболее стабильной пространственной структуры чрезвычайно маловероятно по соображениям, приведенным в начале этой главы. Должны существовать некоторые общие принципы ее формирования, или, как принято говорить, *принципы самоорганизации* макромолекул биополимеров. В значительной мере эти принципы основываются на наличии двух уровней пространственной организации — вторичной и третичной структур.

Самоорганизация белковых молекул начинается с формирования в благоприятных участках небольших фрагментов α-спиралей, а возможно, и β-складок. Такой процесс, требующий конформационной перестройки на небольшом участке полипептидной цепи, может пройти за малые доли секунды, причем на разных участках цепи такие α-спиральные фрагменты могут образовываться практически независимо друг от друга. При этом достаточно образования фрагмента в 2–3 витка, чтобы существенно облегчить свертывание в спираль примыкающих участков цепи, поскольку их движение становится ограниченным, а геометрия — благоприятствующей их подключению к спиральной структуре, если природа их боковых радикалов этому не препятствует. Фактически образование короткой, зародышевой α-спирали является лимитирующей стадией свертывания всего примыкающего участка в более протяженную спираль. Поэтому и в целом образование структурированных фрагментов цепи на всем ее протяжении происходит достаточно быстро.

После образования таких фрагментов для формирования нужной пространственной структуры необходимо, чтобы вошли в контакт те фрагменты, которые должны быть сближены в окончательном варианте. Но для этого теперь требуется не независимое и случайное перемещение всех звеньев молекулы, а только перемещение этих фрагментов как целого. Например, для такого достаточно сложного белка, как уже упоминавшаяся фосфоглицераткиназа, в перемещении участвуют всего лишь 22 структурированных фрагмента вместо более чем 400 аминокислотных остатков. При этом, как и в случае свертывания цепи в α-спираль, всякое установление контакта между двумя такими фрагментами, отвечающее создаваемой конечной структуре, ограничивает степени свободы движения остальных и благоприятствует дальнейшему процессу структурирования. По-видимому, у достаточно сложных белков, состоящих из нескольких доменов, самоорганизация каждого домена происходит независимо от остальных.

Образование высокоорганизованной макромолекулы, естественно, сопровождается существенным уменьшением энтропии системы. По мере повышения температуры поэтому неизбежно наступает момент, когда нативная структура становится термодинамически неустойчивой. Ее разрушение приводит к тому, что полипептидная цепь теряет упорядоченную конформацию и превращается в полимер с непрерывно изменяющейся пространственной структурой. В химии высокомолекулярных соединений такие образования называют статистическим клубком. В биохимии превращение нативного белка в статистический клубок называют *денатурацией* белка. Денатурированный белок лишен всякой биологической активности и в биологических системах может в основном быть использован лишь как источник аминокислот, т.е. как продукт питания.

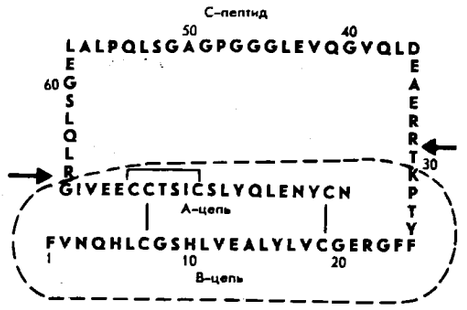


Рис. 31. Первичная структура проинсулина человека. Стрелками показаны связи, гидролизуемые при выщеплении С-пептида при переходе проинсулина в инсулин

Обратное превращение денатурированного белка в нативный возможно лишь в случае, когда нативная структура запрограммирована в первичной структуре. Впервые это было показано на примере уже упоминавшейся в § 2.1 панкреатической рибонуклеазы. Этот белок построен из одной полипептидной цепи, в состав которой входит 8 остатков цистеина, образующих попарно четыре дисульфидных мостика (см. рис. 5). Если с помощью восстановителя разрушить эти мостики, а затем в мягких условиях провести окисление, то в основном восстанавливаются ковалентные связи между теми же остатками цистеина, которые были в исходном нативном ферменте, причем восстанавливается и каталитическая активность фермента. Таким образом, оказывается резко предпочтительной одна из 105 различных комбинаций, в которых могут попарно объединяться остатки цистеина. Это означает, что при окислении в мягких условиях восстановленный белок имеет пространственную организацию, близкую к нативной. Следовательно, первичная структура рибонуклеазы уже в значительной мере предопределяет ее пространственную структуру.

Однако это не всегда возможно. Например, в молекуле инсулина имеется четыре остатка цистеина в А-цепи и два — в В-цепи. После восстановления и последующего реокисления получается сложная смесь продуктов с разными комбинациями дисульфидных сшивок (всего этих комбинаций возможно 15). Поэтому нативный инсулин в клетках поджелудочной железы образуется не из отдельных А- и В-цепей, а из единого полипептида, называемого *проинсулином* (рис. 31), из которого, после того как он сформировал пространственную структуру и в нем замкнулись все необходимые дисульфидные мостики, подвергается обработке ферментами, вырезающими из него так называемый С-фрагмент, превращая проинсулин в две соединенные между собой цепи инсулина.

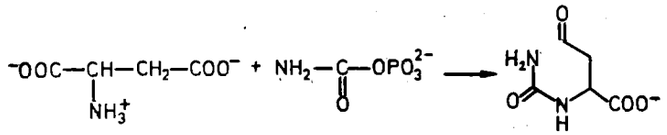
3.6. КОМПЛЕКСЫ БИОПОЛИМЕРОВ. МНОГОСУБЪЕДИНИЧНЫЕ БЕЛКИ

В большом числе случаев для функционирования белков и нуклеиновых кислот необходимо, чтобы несколько полимерных цепей были соединены в единый комплекс. В случае чисто белковых образований такой комплекс также рассматривается как белок, состоящий из нескольких *субъединиц*. Субъединичная структура белков часто фигурирует в научной литературе как *четвертичная структура*, т.е. как уровень организации, следующий за третичной структурой. Нуклеиновые кислоты с комплементарными последовательностями нуклеотидов образуют двуспиральные структуры. При определенных структурных особенностях могут образовываться и структуры, содержащие три цепи,— трехспиральные структуры. Наконец, многие функционально значимые образования содержат как белки, так и нуклеиновые кислоты; такие образования называют *нуклеопротеидами*. В основе образования нуклеопротеидов лежат высокоспецифичные взаимодействия между соответствующими полипептидными и полинуклеотидными цепями, т.е. способность молекул биополимеров к взаимному узнаванию.

Белки состоящие из нескольких субъединиц, широко распространены в природе. Уже указывалось, что гемоглобин состоит из четырех субъединиц, попарно одинаковых. Субъединицы принято обозначать греческими буквами. У гемоглобина имеется две субъединицы, обозначаемые как α-субъединица и две β-субъединицы. Наличие нескольких субъединиц (см. § 3.10) приводит к более благоприятной для функционирования гемоглобина как переносчика кислорода зависимости степени насыщения кислородом от его парциального давления. Четвертичную структуру гемоглобина обозначают как $\alpha_2\beta_2$.

Субъединичное строение свойственно большому числу ферментов и в первую очередь ферментов, выполняющих сложные функции и взаимодействующих с несколькими внешними компонентами. Например, фермент РНК-полимераза из *E.coli* имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, т.е. построен из четырех разнотипных субъединиц, причем α-субъединица продублирована. Этот белок выполняет сложные функции — связывается с двунитевой ДНК, опознает на ней участок, с которого должен начаться процесс транскрипции, связывает субстраты — рибонуклеозидтрифосфаты, катализирует перенос нуклеотидного остатка, отобранного с помощью ДНК-матрицы, на растущую полирибонуклеотидную цепь и еще несколько функций. Хотя детальная роль каждой субъединицы еще не установлена, но достоверно известно, что σ-субъединица не принимает участия в каталитическом процессе, но зато полностью ответственна за связывание с так называемым промотором — участком ДНК, на котором должна оказаться РНК-полимераза, чтобы начать синтез полинуклеотидной цепи в нужном участке ДНК-матрицы (см. § 5.5).

Работа многих белков подвержена так называемой *аллостерической регуляции* — специальные соединения, называемые эффекторами, либо включают, либо выключают работу каталитического центра фермента. Естественно, что такие ферменты имеют специальные участки опознавания эффектора. В ряде случаев такие участки расположены на специальных так называемых *регуляторных субъединицах*. Классическим примером могут служить белки, называемые протеинкиназами, которые катализируют перенос остатка фосфорной кислоты от молекулы АТФ на белки-субстраты. Значение таких процессов введения остатков фосфорной кислоты в некоторые белки рассмотрено в § 10.2. Здесь же существенно отметить, что работа таких ферментов включается взаимодействием со специальным эффектором — аденозин-3′,5′-циклофосфатом (цАМФ). Большинство регулируемых цАМФ протеинкиназ имеют специальные регуляторные субъединицы, на которых расположен центр связывания цАМФ. При этом нередко полностью активный фермент содержит по нескольку как каталитических, так и регуляторных субъединиц. Скорее всего, как и в случае гемоглобина, этим обеспечивается более благоприятный характер зависимости работы фермента от концентрации субстратов и эффектора. Примером таких ферментов является один из наиболее изученных в этом аспекте фермент — аспартаткарбамоилтрансфераза из *E.coli* (см. § 9.6). Она катализирует первую стадию образования пиримидиновых нуклеотидов, состоящую в переносе карбамоильного остатка с карбамоилфосфата на аспартат с образованием карбамоил аспартата:



Фермент регулируется цитидинтрифосфатом, который, связываясь с ферментом, выключает активный центр из работы. Эффектор связывается со специальными регуляторными субъединицами. Полностью активный фермент состоит из шести каталитических и шести регуляторных субъединиц.

В некоторых случаях несколько ферментов, катализирующих последовательные стадии превращения в некоторой цепочке биохимических превращений, объединяются в единый комплекс, который называют *мультиферментным*.

Природа и детальная организация взаимодействий между субъединицами уникальна для каждой пары взаимодействующих субъединиц. В качестве иллюс-

Таблица 3.6. Контакты α-субъединиц с одной из β-субъединиц в гидрокси- и дезоксигемоглобине

α_1	β_2	Гидроокси-	Дезокси-	α_1	β_2	Гидроокси-	Дезокси-
Pro 37	His 146	–	+	Leu 91	Arg 40	+	–
Thr 38	His 97	+	–	Arg 92	Trp 37	+	+
Thr 38	Val 98	+	–	Arg 92	Gln 39	+	–
Thr 38	Asp 99	–	+	Arg 92	Arg 40	+	+
Thr 38	Pro 100	–	+	Val 93	Trp 37	+	–
Thr 38	Tyr 145	–	–	Asp 94	Trp 37	+	–
Lys 40	His 146	–	+	Asp 94	Glu 101	–	+
Thr 41	Arg 91	–	+	Asp 94	Asn 102	+	–
Thr 41	His 97	+	+	Pro 95	Trp 37	+	+
Thr 41	Val 98	+	+	Val 96	Asp 99	+	–
Tyr 42	Arg 40	+	+	Val 96	Glu 101	+	+
Tyr 42	Asp 99	–	+	Tyr 140	Pro 36	+	–

трации в табл. 3.6 приведен перечень контактирующих групп α-субъединиц гемоглобина с одной из β-субъединиц. Контакты приведены для гемоглобина в комплексе с кислородом (оксигемоглобин) и без кислорода (дезоксигемоглобин). Природа взаимодействий в разных участках различна. Наряду с чисто гидрофобными контактами [например, Val (α) 93 — Trp (β) 37; Pro (α) 95 — Trp (β) 37, др.] имеются контакты гидрофильных остатков с гидрофобными, также имеющи ван-дер-ваальсову природу, контакты заряженных остатков с частично полярны ми гидрофобными фрагментами [например, Agr (α) 92 — Trp (β) 37; Tyr (α) 42 Arg (β) 40], которые, по-видимому, обусловлены ион-дипольными взаимодействи ями, контакты между гидрофильными остатками, которые, по крайней мере некоторых случаях, образуют водородные связи [например, Tyr (α) 42 — Asp (99; Asp (α) 94 — Asn (β) 102].

3.7. ДВУСПИРАЛЬНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Объединение двух комплементарных цепей ДНК в единую двуспиральну структуру уже вкратце рассматривалось. Структурные основы такого объединени рассмотрены в § 3.4. Из приведенных там рисунков видно, что такого типа струк туры могут образовывать оба типа нуклеиновых кислот — ДНК и РНК. Возможн образование и смешанных комплексов, состоящих из одной полирибонуклеотид ной и одной полидезоксирибонуклеотидной цепей. Такие двуспиральные структ ры часто называют дуплексами. Общий план построения таких структур не озн чает их полной идентичности. Они достаточно четко могут различаться по свое детальной геометрии.

Двунитевая ДНК на основном протяжении имеет так называемую *B-конформа цию*. Для этой конформации характерен шаг спирали 3,4 нм и число пар гетероциклов на один виток спирали равно десяти. Плоскость, в которой находятся взаимодействующие гетероциклы, практически перпендикулярна оси спирали (угол наклона пары около 6°).

Если вокруг оси двойной спирали описать цилиндр, вмещающий всю двуспиральную структуру, то нетрудно заметить из рис. 26 и 32, что взаимодействующая пара гетероциклов заполняет не все сечение этого цилиндра — по обе стор ны от них остаются полости, которые тянутся вдоль всего двуспирального учас ка, образуя два желоба. В один из них экспонированы атом N7 пуринового гет роцикла и связанные водородными связями NH_2-группа аденина или цитозина C=O-группа соответственно тимина или гуанина. Этот желоб в *B*-ДНК имеет больший размер, чем противоположный, и обычно называется большим желобом. Конформационные и геометрические параметры *B*-конформации ДНК приведены в табл. 3.7.

Другая распространенная двуспиральная структура называется *A-конформацией*. ДНК может принимать такую конформацию, если находится в виде волокнистой структуры при пониженной относительной влажности. При повышенной влажности и тем более в растворе ДНК находится в *B*-конформации. Конформация *A* характерна для РНК. У этой конформации шаг спирали существенно меньше и составляет 3,0 нм, а число пар нуклеотидов на один виток спирали равно 11. В результате этого расстояние между остатками вдоль оси спирали составляет всего 0,27 нм вместо 0,34 нм у *B*-ДНК. Нормаль к плоскости гетероциклов обра-

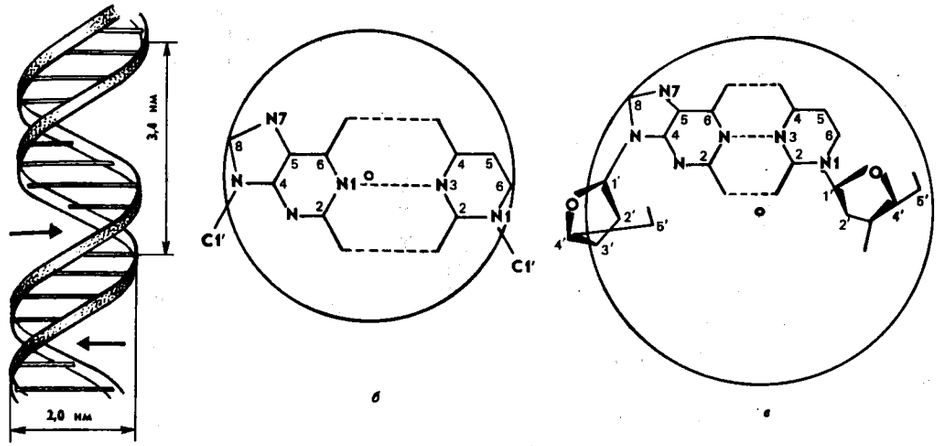


Рис. 32. Двойная спираль ДНК в *B*-форме (*а*, *б*) и в *Z*-форме (*в*):

а – *B*-форма представлена в виде двуспиральной ленты, комплементарные пары нуклеотидов – в виде соединяющих их линий. Стрелками указаны большие бороздки *B*-формы. Ось спирали лежит в плоскости рисунка; *б* – взаимодействие гетероциклов в *B*-форме ДНК. Ось спирали (•) перпендикулярна плоскости рисунка; *в* – взаимодействие гетероциклов в *Z*-форме ДНК. Ось спирали (•) перпендикулярна плоскости рисунка

пары, то у *A*-РНК и *A*-ДНК она смещена на 0,44 нм в сторону большого желоба, который в результате этого становится существенно глубже, но одновременно уже, чем у *B*-ДНК. Основные количественные характеристики *A*-конформации также приведены в табл. 3.7.

Таблица 3.7. Конформационные и геометрические параметры ДНК

Параметры	Форма спирали		
	A	*B*	*Z*
Тип и ориентация спирали	Правая регулярная	Правая регулярная	Левая бирегулярная
Число пар гетероциклов на один виток спирали n	11	10	12(6×2)
Шаг спирали H, нм	2,86(3,0)	3,4	4,5(1,35)
Расстояние между гетероциклами вдоль оси спирали h, нм	0,27(0,26)	0,34	0,37
Ориентация гликозидной связи и конформация сахара	*анти*-C3′-*эндо*-	*анти*-C2′-*эндо*-	*анти*-, *син*-чередующаяся

Уже говорилось, что важной особенностью уотсон-криковских взаимодействий является их малая зависимость от последовательности нуклеотидов в одной из полинуклеотидных цепей. В случае же некоторых специфических последователь-

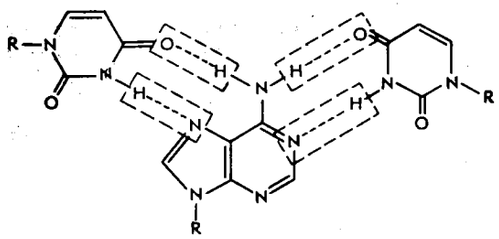


Рис. 33. Взаимное расположение гетероциклов в тройном комплексе полиаденилово кислоты с двумя цепями полиуридиловой кислоты

ностей возможно образование других спиральных структур. Некоторые примеры приведены ниже.

Полиаденилова кислота и ее дезоксианалог могут образовывать с комплементарной полиуридиловой или полидезокситимидиловой цепями тройные комплексы, которые входят две полипиримидиновые цепи. В плоскости, перпендикулярной оси спирали, взаимное расположение гетероциклов имеет вид, представленный на рис. 33. Две главные особенности этой структуры состоят в том, что, во-первых, одна из полипиримидиновых цепей ориентирована параллельно полиаденилово, а во-вторых, пиримидиновый гетероцикл этой цепи образует не уотсон-криковские, так называемые хугстиновские водородные связи с участием атома N7 аденина. Аналогичные трехспиральные структуры могут образовывать полигуаниловая и две полицитидиловые цепи, однако для этого требуется слабокислая среда, поскольку одна из полицитидиловых цепей должна быть протонирована по N цитозина. Такие же структуры могут иметь и нерегулярную последовательность нуклеотидов, однако при этом необходимо, чтобы одна цепь была полностью из пуриновых нуклеотидов, а две другие имели комплементарные полипиримидиновые последовательности — одна при параллельной, а другая при антипараллельной ориентации относительно полипуриновой цепи.

Примером структуры еще более высокого порядка может служить приведенная на рис. 34 четырехнитевая структура, образуемая в результате взаимодействия в одной плоскости четырех остатков гуанина. Как видно из приведенной схемы, она может реализоваться либо при взаимодействии четырех параллельно ориентированных нитей, либо при взаимно антипараллельной ориентации каждой пары соседних нитей при чередовании *син-* и *анти*-конформаций остатков гуанозина (или дезоксигуанозина).

Если на некотором протяжении последовательность нуклеотидов в ДНК представлена чередующимися остатками ГМФ и ЦМФ, то при достаточно высокой концентрации соли она может образовывать левую спираль, получившую название *Z*-ДНК (см. рис. 32). В этой структуре сохраняются те же уотсон-криковские взаимодействия между цитозином и гуанином, однако гуанин в этом случае участвует в стабилизации спирали, находясь в син-конформации. Структуры рибозофосфатного остова для пуринового и пиримидинового фрагментов у *Z-конформации* резко отличаются, как видно из данных, приведенных в табл. 3.7. Шаг спирали составляет 4,5 нм, т.е. существенно больше, чем у *B*-ДНК. На один виток спирали приходится 12 нуклеотидных звеньев в каждой из цепей. Однако вследствие резкого отличия в структуре пуринового и пиримидинового нуклеотидов повторяющейся структурной единицей следует считать не мононуклеотид, а динуклеотид, т.е. на один виток спирали приходится 6 повторяющихся фрагментов.

На примере *Z*-ДНК видно, что при определенных последовательностях нуклеотидов в некотором участке ДНК оказывается возможной структура, резко отличающаяся от *B*-формы. По-видимому, возможно и полное нарушение двуспиральной структуры в некоторой области при наличии в ней специфических последовательностей нуклеотидов. Одним из наиболее изученных случаев является крестообразная структура, которая может возникать у двунитевой ДНК, если на одной из ее нитей (это автоматически должно выполняться для второй нити) имеется последовательность, способствующая образованию шпильки, т.е. имеющая вслед за некоторой произвольной последовательностью комплементарную обращенную последовательность. Нетрудно убедиться, что это означает наличие в исходной двуспиральной структуре двух идентичных фрагментов, направленных навстречу один другому. Такие пары структур получили название *обращенных повторов*. Как видно из рис. 35, можно представить себе превращение участка с обращенными повторами в две однонитевые шпильки, которые вместе с остальной частью цепи образуют фигуру типа креста.

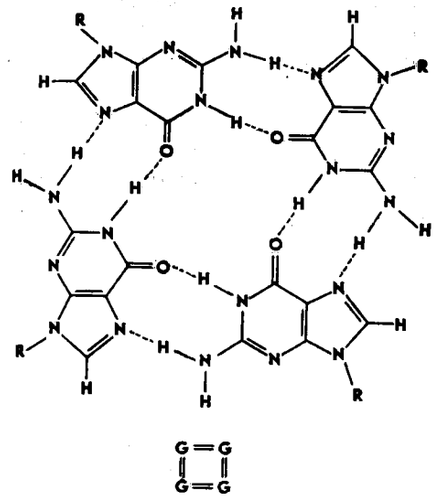


Рис. 34. Структура тетрамерной полигуаниловой кислоты

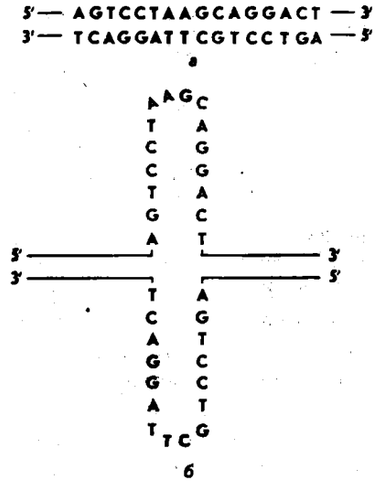


Рис. 35. Фрагмент цепи ДНК с обращенным повтором:

а — в виде линейного дуплекса; *б* — в виде структур типа креста

Если имеется сколь угодно длинная двуспиральная структура со свободными концами, то она имеет на всем протяжении *B*-конформацию, слегка искаженную тепловым движением, приводящим к изгибанию палочкообразной двойной спирали. Так выглядит ДНК под электронным микроскопом (рис. 36). Если же тем или иным способом один конец ДНК закреплен, то можно представить себе поворот структуры вокруг оси спирали либо по часовой стрелке (положительное направление), либо против часовой стрелки (отрицательное направление). В первом случае произойдет как бы дополнительное закручивание двойной спирали, во втором — частичное раскручивание. Если теперь закрепить второй конец, то двойная спираль окажется несколько искаженной. В клетках это может происходить, например, в результате прочного взаимодействия концов ДНК с молекулами белка, встроенными в мембранную структуру клетки. В гомогенной системе наиболее изучена ситуация, когда концы каждой из цепей соединены между

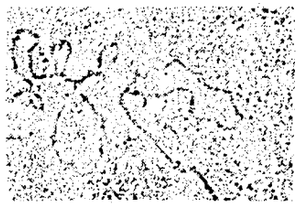


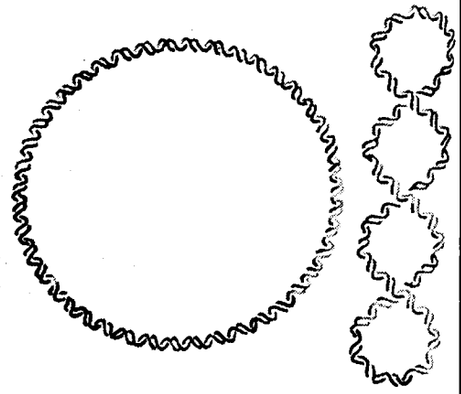
Рис. 36. Вид ДНК под электронным микроскопом

собой с образованием двух комплементарных связанных уотсон-криковскими парами циклических молекул. Такие ДНК называют *кольцевыми* двунитевыми ДНК. Вследствие нарушения термодинамически наиболее выгодной *B*-конформации полученная ДНК имеет напряженную пространственную структуру. Одним из путей, которым можно вернуть ДНК в более устойчивое состояние, является закручивание двойной спирали как целого, т.е. рассматриваемой как единая нить, в спиральную фигуру, которую в этом случае называют *суперспиралью* или *сверхспиралью* (рис. 37). При этом если закручивание проводилось вправо, то должна образоваться левая суперспираль, а если закручивание происходило влево — правая суперспираль. Образование суперспирали — не единственный путь релаксации возникшей напряженной структуры. Столь же эффективно может быть разделение нитей ДНК на некотором участке, позволяющее принять остальной части ДНК двуспиральную структуру с геометрическими параметрами *B*-формы. Если двойная спираль была перекручена, то при наличии на некоторых ее участках необходимых последовательностей она может образовать на этих участках левую *Z*-форму, чем скомпенсировать перекручивание.

Двунитевые нуклеиновые кислоты, образование которых из однонитевых полинуклеотидов связано с существенным упорядочиванием системы и, следовательно, с существенным уменьшением энтропии, устойчивы лишь до определенных температур.

При более высоких температурах они становятся термодинамически неустойчивыми, происходит расхождение нитей. Этот процесс называют *денатурацией* или *плавлением*. Последний термин связан с тем, что переход происходит в узком диапазоне температур и в известной мере напоминает фазовый переход. Среднюю температуру, соответствующую плавлению половины дуплексов, называют *температурой плавления*. Эта величина зависит от длины взаимодействующих комплементарных последовательностей, причем растет с ростом длины вплоть до некоторого предельного значения.

Прочности дуплексов способствует повышение содержания в цепях пар гуанин — цитозин, поскольку в отличие от пар аденин — тимин (или аденин — урацил) они образуют три, а не две водородные связи. Прочность повышается при увеличении ионной силы раствора, поскольку при этом ослабляется дестабилизирующий эффект электростатического отталкивания положительно заряженных ионных атмосфер, окружающих полианионные цепи нуклеиновых кислот. Дуплексы, как правило, резко дестабилизируются при добавлении органических растворителей. Поэтому денатурацию



а *б*

Рис. 37. Кольцевая двуспиральная ДНК (*а*) и она же в виде суперспирали (*б*)

можно осуществлять не только повышением температуры, но и добавлением органических растворителей, например формамида.

Образование стопок пар гетероциклов в результате стекинг-взаимодействий, которое является важным фактором стабилизации двунитевых нуклеиновых кислот, приводит к существенному понижению молярных коэффициентов экстинкции гетероциклов (до 40%) по сравнению со свободными мономерами в области 260 нм. Это явление получило название гипохромного эффекта. Поэтому плавление дуплексов сопровождается эквивалентным возрастанием оптической плотности раствора нуклеиновой кислоты (гиперхромный эффект). Это позволяет легко наблюдать и регистрировать процесс плавления непосредственно в кювете спектрофотометра. Зависимость оптической плотности раствора двуспиральной нуклеиновой кислоты от температуры называют *кривой плавления*. На рис. 38 приведена кривая плавления для дикого штамма ДНК фага λ (48 000 пар нуклеотидов, среднее содержание G—C-пар $\sim$ 50%).

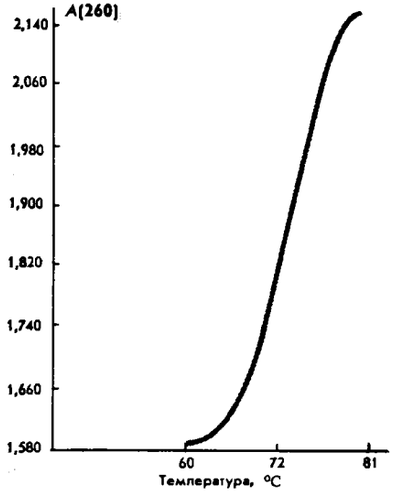


Рис. 38. Кривая плавления ДНК дикого штамма фага λ (48 000 пар нуклеотидов). Среднее содержание пар GC 50%. Буфер: Na_2HPO_4, Na^+ 0,2 ммоль/л, ЭДТА 0,1 ммоль/л, pH 7 (по данным Лохова С.Г.)

Плавление представляет собой кооперативный процесс, в котором одновременно участвуют достаточно протяженные участки полинуклеотидных цепей, а в случае не слишком длинных фрагментов — целиком обе цепи. Дело в том, что разрушение каждой отдельной взаимодействующей пары гетероциклов сопровождается существенным ростом энтальпии, порядка 30 — 40 кДж/моль на каждую пару. В то же время разрушение небольшого числа пар в пределах дуплекса сопровождается незначительным падением уровня упорядоченности и не приводит к достаточному для компенсации ΔH возрастанию энтропии.

Обратный процесс образования дуплекса из двух комплементарных цепей называют *ренатурацией* или *гибридизацией*. Первый термин чаще применяют, когда речь идет о воссоединении предварительно разделенных цепей. Второй термин обычно используют, если речь идет об образовании дуплекса однонитевой нуклеиновой кислотой, к которой извне добавлена комплементарная цепь или фрагмент такой цепи. Для функционирования биологических систем процессы ренатурации, по-видимому, большого значения не имеют, поскольку в живой природе дуплексы образуются главным образом при построении на однонитевой ДНК или РНК комплементарной нити путем синтеза из мономеров. Однако образование двунитевых структур из предсуществующих полинуклеотидных цепей используется в целом ряде фундаментальных и прикладных биохимических исследований.

Взаимодействие полинуклеотидных цепей начинается со встречи их фрагментов, т.е. отдельных нуклеотидных звеньев. Подобно уже рассмотренному вкратце в предыдущем параграфе формированию полипептидных α-спиралей, образова-

нию протяженной двуспиральной структуры должно предшествовать возникновение зародышевой структуры из нескольких пар нуклеотидов. Отдельная комплементарная пара, не стабилизированная стекингом с соседними парами, неустойчива и быстро разрушается. В то же время зародыш двойной спирали благоприятствует сближению соседних комплементарных звеньев и замыканию новых пар. Это, в свою очередь, фиксирует в благоприятной ориентации следующие пары и т.п. Происходит как бы застегивание двуспиральной структуры подобно застегиванию «молнии». Если это происходит при температуре ниже области плавления дуплекса, то процесс оказывается практически необратимым. Если же зародыш образовался на участке, где может сформироваться лишь небольшой по протяженности двунитевой фрагмент, то время его жизни при не слишком низких температурах невелико и за короткое время пройдет его разрушение, что приведет лишь к некоторой задержке в поиске надлежащего фрагмента комплементарной цепи. Следует иметь в виду, что для протяженных полинуклеотидных цепей вероятность образования таких случайных контактов между цепями достаточно велика. Например, одна и та же пентануклеотидная последовательность в среднем должна встречаться один раз на каждые $4^5 \approx 1000$ нуклеотидов. При низких температурах у протяженных цепей такие задержки могут оказаться довольно длительными, поэтому процессы ренатурации (гибридизации) проводят при температурах, не слишком далеко отстоящих от температуры плавления формируемого дуплекса.

3.8. НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Среди многочисленных классов нуклеопротеидов наиболее изученными являются три — рибосомы, хроматин и вирусы.

Рибосомы являются сложными клеточными органеллами, на которых происходит биосинтез белков. Их линейные размеры имеют порядок 20 нм, в связи с чем они невидимы в световом микроскопе, но отчетливо видны под электронным микроскопом. Общей чертой всех рибосом является легкая диссоциация, происходящая при уменьшении концентрации ионов магния до 10^{-3} М, на две частицы именуемые *рибосомными субъединицами*. Они неодинаковы по размеру и обозначаются как малая и большая субъединицы.

Для обозначения рибосом, их субъединиц и входящих в их состав рибонуклеиновых кислот принято использовать величины их констант седиментации, приведенные к температуре 20°С и вязкости чистой воды и, как правило, округленные до ближайших целочисленных значений. Так, рибосомы прокариот обозначают как 70S рибосомы, а их субъединицы — как 50S и 30S субъединицы. Рибосомы эукариот крупнее по размеру и их обозначают как 80S рибосомы, а две субъединицы — как, соответственно, 60S и 40S рибосомы. В митохондриях и хлоропластах имеются свои рибосомы, которые по размерам и строению близки к прокариотическим. Обе субъединицы рибосом являются нуклеопротеидами, состоящими из одной или нескольких молекул РНК и значительного числа *рибосомных белков*. Малая субъединица прокариотических рибосом содержит одну молекулу РНК, обозначаемую как 16S рРНК, и 21 белок, которые обозначаются номерами с указанием, что они относятся к малой (англ. — small) субъединице с помощью буквы S, стоящей перед номером белка. Нумерация проводится в соответствии с молекулярной массой белков в порядке ее убывания, так что самый большой белок — это S1, а самый маленький — S21. Большая субъединица (англ.— large) содержит две молекулы РНК, 23S рРНК и 5S рРНК и 32 разных белка, обозначаемых соответственно L1, L2 и т.д. К настоящему времени для рибосом *E.coli* установлены первичные структуры всех составляющих их РНК и белков. Установлены первичные структуры большого числа рибосомных РНК эукариот, в том числе для рибосом человека. Быстрыми темпами развиваются работы по структуре рибосомных белков крысы и человека. Известно, что 40S субъединица содержит 18S рРНК, а 60S субъединица — три РНК, обозначаемые обычно как 28S, 5,8S и 5S рРНК. Число белков на обеих субъединицах несколько выше, чем у прокариотических рибосом. Рибосомы, как уже говорилось, являются местом трансляции информации, поступающей в виде информационной РНК, в полипептидные цепи синтезируемых на рибосомах белков. Этот процесс будет рассмотрен в § 5.6.

Хроматин является основным нуклеопротеидом эукариотических клеток и содержится в клеточном ядре. Он представляет собой двунитевую молекулу ДНК, по-видимому, представленную одной копией на каждую из хромосом, связанную со сложным набором белков. В структурном плане наиболее изучены белки, называемые *гистонами*. Это сильноосновные белки, содержащие около 25% лизина и аргинина. Известно пять гистонов — H1, H2A, H2B, H3 и H4. Будучи выделен из ядер, хроматин имеет определенную структуру, которая представляет собой многочисленные агрегаты из восьми молекул гистонов (по две каждого, кроме H1), на которые навернута двунитевая ДНК, причем в контакте с каждым октамером гистонов связан участок в 140 пар нуклеотидов. Такие структуры называют *нуклеосомами*. Между нуклеосомами имеется соединительный участок, содержащий около 60 пар нуклеотидов, не связанный с гистонами в нуклеосомы. Кроме того, в состав хроматина входит значительное число других белков, объединяемых общим названием негистоновые белки.

Поскольку ДНК хроматина на определенной фазе жизнедеятельности клетки должна удваиваться, а кроме того, на ней, как на матрице, должны синтезироваться новые молекулы РНК, то в тесном контакте с хроматином находится весь аппарат, принимающий участие в синтезе новых молекул ДНК и РНК, а также весь аппарат, участвующий в исправлении повреждений, возникающих по тем или иным причинам в молекулах ДНК, т.е. весь аппарат репарации ДНК. Каждый из этих процессов — репликация, репарация и транскрипция ДНК в клетках эукариот — требует участия целого набора ферментов и вспомогательных белковых факторов. Поэтому полная картина функционирующего хроматина является исключительно сложной и во многих деталях еще не установленной.

Вирусы — это частицы, построенные из одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты и нескольких белков, иногда некоторых других дополнительных компонентов, например фосфолипидов. Вирусы представляют собой нуклеопротеиды, способные, попадая внутрь соответствующих клеток, интенсивно воспроизводиться с образованием большого числа новых вирусных частиц. Вне клеток никаких признаков жизнедеятельности вирусы не проявляют. Однако, проникая внутрь определенных клеток, которые выполняют по отношению к вирусу функции хозяина, вирусные частицы с помощью своей нуклеиновой кислоты перепрограммируют работу клетки, и в ней начинается размножение вирусной нуклеиновой кислоты и производство вирусных белков. Процесс, как правило, завершается формированием зрелых частиц вируса и разрушением

плазматической мембраны клетки (*лизисом*), после чего вышедшие наружу вирусы получают возможность инфицировать новые хозяйские клетки. Существуют вирусы, паразитирующие в растительных клетках, в животных клетках, в том числе в клетках человека, вызывая различные вирусные заболевания. Вирусы могут паразитировать и на бактериальных клетках; их называют *бактериофагами* или просто *фагами*.

Описанный наиболее типичный путь развития вирусной инфекции называют литическим. В некоторых случаях наряду с литическим типом инфекции возможен другой путь — лизогенный, при котором ДНК вируса встраивается в хромосому хозяина и на протяжении многих циклов деления клеток хозяина размножается в составе хозяйской ДНК. В некоторых специальных условиях, например при УФ-облучении или действии проникающей радиации, ДНК вируса может выйти из состава хромосомной ДНК и переключиться на литический путь развития. Наиболее детально лизогенный путь развития изучен на примере бактериофага λ, паразитирующего на клетках *E.coli*.

Принципы построения вирусов весьма разнообразны. У всех известных клеточных организмов наследственная информация хранится, размножается и реализуется в форме двунитевых ДНК. Среди вирусов также широко распространены такие, у которых носителем наследственной информации является двунитевая ДНК. К их числу относятся многие бактериофаги, например детально изученные бактериофаги, паразитирующие на клетках *E.coli*, такие, как T4, T7, и уже упоминавшийся бактериофаг λ. Для двух последних уже установлены полные первичные структуры их ДНК. К числу таких вирусов относятся и многие вирусы, вызывающие заболевания человека, например вирус герпеса и аденовирусы, вирус осповакцины (коровьей оспы), который на протяжении двух столетий использовался для вакцинации людей (придания им иммунитета) против черной оспы. Наряду с этим встречаются вирусы, у которых в состав вирусных частиц входит однонитевая ДНК. К ним относятся такие хорошо изученные и широко используемые в исследованиях вирусы, как бактериофаг φ X174 — первый вирус, для которого была установлена первичная структура ДНК, — и бактериофаг M13, нашедший широкое применение в генетической инженерии.

У большой группы вирусов носителем наследственной информации является РНК, чаще всего однонитевая. Многочисленные РНК-содержащие вирусы паразитируют на растениях. Многие важнейшие открытия в вирусологии были сделаны на содержащем однонитевую РНК вирусе табачной мозаики. Такие вирусы известны и среди бактериофагов, например фаги MS2 и Qβ. Среди РНК-содержащих вирусов есть и такие, которые вызывают тяжелые заболевания человека, например клещевой энцефалит и бешенство. В большинстве случаев РНК представляет собой одну достаточно длинную цепочку, содержащую много тысяч нуклеотидов. Однако в отдельных случаях в состав вируса входит несколько молекул РНК, каждая из которых программирует один или несколько белков. К их числу относится вирус гриппа, в состав которого входят восемь однонитевых молекул РНК.

Вирусы весьма разнообразны по размерам. В значительной мере это определяется тем, сколько информации заложено в нуклеиновую кислоту вируса. Эта информация в основном предназначена для программирования синтеза белков, входящих в состав вирусных частиц (структурные белки) или необходимых на промежуточных этапах их формирования (неструктурные белки). Простейшие вирусы, например уже упоминавшиеся РНК-содержащие бактериофаги MS2 и $Q\beta$, содержат программу для синтеза всего трех белков — белка оболочки, фермента РНК-репликазы, катализирующего синтез новых молекул вирусной РНК, и белка, участвующего в регуляции синтеза новых частиц. В то же время огромный бактериофаг T4, содержащий много белков, образующих оболочку, требующий значительного набора ферментов для его развития внутри клетки, программирует даже синтез нескольких тРНК. Общее число белков и нуклеиновых кислот, запрограммированных в молекуле ДНК этого бактериофага, составляет около 150. Некоторые сведения о строении ряда наиболее типичных представителей вирусов и бактериофагов приведены в табл. 3.8. Наиболее важные и типичные особенности содержания и функционирования программ, заложенных в вирусных нуклеиновых кислотах, рассмотрены в § 5.7.

Таблица 3.8. **Строение ряда типичных представителей вирусов и бактериофагов**

Вирусы	Природа генетического материала	Число программируемых белков
Вирусы		
грипп А	Одноцепочечная РНК (минус-цепь), фрагментированная (8 фрагментов)	10
энцефалита	Одноцепочечная РНК (плюс-цепь)	9
гепатита А	То же	4
гепатита В	Частично двуцепочечная ДНК, кольцевая	5
ВИЧ-1	Одноцепочечная РНК (плюс-цепь)	13
SV-40	Двуцепочечная ДНК, кольцевая	5
Реовирусы	Двуцепочечная РНК, линейная, фрагментированная (10-11 фрагментов)	11
Бактериофаги		
λ	Двуцепочечная ДНК, линейная, в клетке кольцевая	38
T4	Двуцепочечная ДНК, линейная	$\geqslant$130
T7	То же	38
MS2	Одноцепочечная РНК (плюс-цепь)	3
$Q\beta$	То же	3
M13	Одноцепочечная ДНК (плюс-цепь)	8
φX174	То же	9

В заключение этого и двух предыдущих параграфов следует отметить, что сборка многокомпонентных надмолекулярных структур, несмотря на заложенную в их компоненты способность к взаимному узнаванию, скорее всего не является самопроизвольным процессом. В настоящее время накопились факты, указывающие на более сложный характер образования многосубъединичных белков и нуклеопротеидов, требующих участия вспомогательных белков, которые далее в конечной структуре не присутствуют. Возможно, это относится и к формированию третичной структуры достаточно сложных белков. Установлено, что в этих процессах в большинстве случаев, если не всегда, принимают участие специальные белки, называемые *шаперонами*. Эти белки были первоначально обнаружены

у *Escherichia coli*, когда оказалось, что некоторые наследственные изменения (мутации) в белках GroE и GroL приводят к тому, что в них не может сформироваться полноценный бактериофаг λ, хотя весь необходимый набор белков и ДНК фага в клетке накапливаются. Оказалось, что нарушение в сборке этого довольно сложно устроенного бактериофага происходит от того, что мутантные белки GroE и GroL не могут обеспечить правильное соединение между собой 12 субъединиц элемента, нужного для соединения головки фага с его хвостовой частью.

Дальнейшее развитие биохимии привело к открытию огромного числа шаперонов, особенно у эукариот, где эти белки нередко специализируются на сборке вполне определенных структур. Эта группа белков известна также под названием *белков теплового шока*, поскольку их активный синтез начинается при повышенной температуре, по-видимому, для предотвращения повреждения разнообразных белков и их комплексов, претерпевающих частичную денатурацию при температуре выше допустимой.

3.9. НАПРАВЛЕННЫЕ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ В БИОПОЛИМЕРАХ

Когда речь идет о наличии у функционально активных биополимеров определенной пространственной структуры, последняя, естественно, не представляется абсолютно жесткой. При биологически значимых температурах в результате теплового движения происходят не только поступательное перемещение и вращение незакрепленных молекул биополимера как целого и колебания атомов, но и некоторые повороты вокруг отдельных связей, если они не затрагивают слишком большого числа атомов и атомных групп. Даже если такие повороты происходят на функционально значимых участках биополимера, принимающих участие в специфическом связывании какого-либо партнера, это может не иметь существенных функциональных последствий. Вращение вокруг четырех связей C—C радикала лейцина $-CH-CH_2-CH(CH_3)_2$, как правило, не может вывести его за пределы участка, формирующего район узнавания гидрофобной части партнера. Точно так же вращение вокруг связи $C_\alpha-C_\beta$ амидного фрагмента аминокислоты аспарагина не должно драматически повлиять на его тенденцию к образованию водородных связей с соответствующим гидрофильным участком узнаваемой молекулы. Такого рода изменения, являющиеся неотъемлемыми компонентами теплового движения, не рассматриваются как изменения конформации биополимера в целом.

Однако для большого числа, а возможно, и для большинства функционально активных белков и нуклеиновых кислот могут происходить и глубокие изменения конформации, приводящие к новой структуре с резко отличающимися от исходной свойствами, в том числе способностью выполнять определенные биологические функции. Такие изменения могут существенно повлиять на взаимное расположение групп, участвующих в узнавании специфического лиганда, либо усиливая, либо ослабляя взаимодействие с этим лигандом. Одним из таких изменений является денатурация биополимера, что, как правило, приводит к полностью неактивным молекулам, причем нередко это изменение оказывается необратимым. Однако это может быть и переход в новую определенную структуру, достаточно резко отличающуюся от исходной, но имеющую свой структурный облик, подверженный лишь тепловым флуктуациям. Такие изменения получили название направленных *конформационных переходов*. Речь идет именно о направленных переходах, поскольку если молекула вышла из некоторой устойчивой конформации, то случайное достижение некоторой другой определенной конформации, как уже не раз говорилось, требует абсурдно большого времени.

Конформационные переходы происходят при определенных изменениях условий, в которых находится биополимер. В некоторых случаях для него достаточно изменения температуры. Например, из тканей длительно голодавших кроликов наряду с активной выделяется неактивная форма тРНК, присоединяющей лейцин. Такая тРНК при действии фермента, катализирующего реакцию присоединения лейцина, не способна к этому химическому превращению. Для перевода в активную форму ее необходимо прогреть при определенных значениях pH и ионной силы. Однако наибольшее значение в биохимических процессах имеют конформационные изменения биополимера, происходящие при присоединении к нему специфического партнера.

Следует подчеркнуть, что констатация факта конформационного превращения и установление его природы — задачи совершенно разного порядка сложности. Любое изменение каких-либо свойств биополимера может свидетельствовать о конформационном переходе, если есть уверенность, что не произошло более глубоких, химических изменений. Действительно, все химически идентичные молекулы могут отличаться в структурном плане только своей конформацией. В то же время любое изменение физических характеристик или функций может явиться следствием только какого-либо изменения структуры, и если химические изменения исключены, то в рамках наших сегодняшних знаний не остается другого варианта, как приписать наблюдаемое изменение конформационному переходу.

В атомном разрешении, т.е. с описанием геометрии смещения всех участвующих в конформационном переходе атомов, удалось исследовать небольшое число переходов в тех случаях, когда были закристаллизованы и подвергнуты рентгеноструктурному анализу высокого разрешения белки в двух различных состояниях. Одним из таких примеров является гемоглобин, который был исследован как в свободном состоянии (дезоксигемоглобин), так и в комплексе с кислородом (оксигемоглобин). Эти состояния заметно отличаются по своей пространственной структуре, что видно по изменению характера контактов между его субъединицами при присоединении кислорода. Сопоставление данных, приведенных в табл. 3.6, для дезокси- и оксигемоглобина показывает, что из 17 пар взаимно контактирующих групп α-субъединицы с одной из β-субъединиц при присоединении кислорода сохраняется только 8, но одновременно появляется 9 новых пар взаимодействующих аминокислотных остатков. В частности, водородная связь между Tyr(α) 42 и Asp(β) 99 исчезает и заменяется на совершенно другую водородную связь Asp(α) 94 с Asn(β) 102. Все эти данные свидетельствуют о перемещении значительного числа аминокислотных остатков в обеих субъединицах, т.е. о направленном изменении конформации.

При трактовке направленных конформационных переходов обычно исходят из предположения, что в системе обе конформации существуют в равновесии, причем взаимопревращения между ними происходят за малое время. Наблюдаемые физические, химические и функциональные свойства относятся к той из конформаций, которая является преобладающей, а конформационный переход наблюдается в результате смещения равновесия, первоначально сдвинутого в сторону

одной из конформаций, в направлении другой конформации. Если конформационный переход происходит в результате изменения температуры, ионной силы раствора или pH среды, то это означает, что константа равновесия, характеризующая переход, резко зависит от соответствующих параметров. В частности, для температурного перехода это означает довольно высокое абсолютное значение ΔH перехода.

Конформационные переходы, происходящие при связывании с биополимером специфического лиганда, с этой точки зрения могут быть объяснены как результат резкого различия сродства этого лиганда к двум конформерам. Действительно, пусть существует равновесие между двумя конформерами R и T, описываемое при определенных условиях константой равновесия K. Оба конформера способны связывать лиганд с контантами ассоциации, соответственно K_R и K_T:

$$[T]/[R] = K, \tag{3.1}$$

$$[RL]/[R][L] = K_R, \tag{3.2}$$

$$[TL]/[T][L] = K_T. \tag{3.3}$$

Можно ввести кажущуюся константу равновесия, характеризующую отношение общего количества биополимера в конформации T (т.е. количество биополимера как в свободном виде, так и в виде комплекса с лигандом) к общему количеству биополимера в конформации R в присутствии лиганда L. Выражение для этой константы $K_{каж}$ запишется в виде

$$K_{каж} = \frac{[T] + [TL]}{[R] + [RL]} = \frac{[T]}{[R]} \frac{1 + K_T[L]}{1 + K_R[L]} = K \frac{1 + K_T[L]}{1 + K_R[L]}. \tag{3.4}$$

Преобладание в свободном состоянии конформера T означает, что $K \gg 1$. Однако если при этом сродство лиганда к конформеру R настолько превышает сродство к конформеру T, что $K_R/K_T \gg K$, то при достаточно высокой концентрации лиганда величина $K_{каж}$ окажется существенно меньше единицы, т.е. в системе будет преобладать конформер R. Способность к направленным конформационным переходам является второй важнейшей для их функционирования особенностью биополимеров, в первую очередь белков. Само по себе узнавание белком или нуклеиновой кислотой некоторого партнера может служить лишь целям создания некоторой надмолекулярной конструкции, например сборке рибосом или вирусных частиц. В большинстве функционально значимых случаев узнавание специфичного партнера является сигналом к некоторому последующему действию, причем такому, к которому биополимер, не будучи связан с лигандом, был не способен. Но это означает, что под действием лиганда в биополимере должно произойти некоторое изменение его свойств, а следовательно, и структуры. В большом числе случаев белок должен иметь возможность выполнить свою функцию многократно и поэтому изменение структуры должно быть обратимым. Но таким изменением в первую очередь может быть направленное изменение конформации биополимера.

Конформационные изменения играют важную роль в функционировании ферментов и в регуляции активности ферментов. Этот аспект проблемы направленных конформационных переходов будет предметом специального рассмотрения в гл. 6 и 10 и здесь опущен. При восприятии сигнала, поступающего в виде гормона или нейромедиатора на рецепторы воспринимающих клеток, последние должны отреагировать на это определенными физиологическими процессами — передать возбуждение по воспринимающему сигнал нейрону, вызвать мышечное сокращение, включить производство какого-либо вещества. До получения сигнала рецептор этих действий не вызывал. Резонно полагать, что под действием специфического лиганда в рецепторе произошел конформационный переход, который изменил характер взаимодействия рецептора, причем именно его внутриклеточной части с воспринимающими сигнал клеточными структурами.

Аналогичное рассуждение можно провести для транспорта веществ через клеточную мембрану с помощью специальных транспортных белков. Если, например, белок осуществляет транспорт лактозы, то он должен обладать способностью образовывать специфический комплекс с находящимися вне клетки молекулами лактозы. Но для этого фрагмент белковой молекулы, узнающий лактозу, должен находиться на наружной по отношению к мембране поверхности транспортного белка, в данном случае β-галактозидпермеазы. Поэтому само по себе узнавание не может привести к попаданию лактозы внутрь клетки. Необходимо, чтобы образование комплекса вызвало такое изменение пространственной структуры, при котором область узнавания вместе со связанным сахаром переместилась внутрь клетки. Диссоциация комплекса в этом случае привела бы к попаданию лактозы внутрь клетки, а лишенная лактозы β-галактозидпермеаза должна была бы вернуться в исходное конформационное состояние с центром узнавания, экспонированным наружу.

Направленные конформационные изменения лежат в основе и других видов перемещения в биологических системах, в том числе в основе работы аппарата мышечного сокращения и, по-видимому, перемещения молекул, несущих информацию, относительно устройств, считывающих эту информацию: мРНК относительно рибосом, ДНК относительно ДНК- и РНК-полимераз.

3.10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БИОПОЛИМЕР — ЛИГАНД

Как уже отмечалось в § 3.2, взаимодействие биополимера со специфическим лигандом не сопряжено с преодолением существенных энергетических барьеров и является быстрым процессом. Поэтому чаще всего исследователи имеют дело с равновесными системами, требующими термодинамического описания. В дальнейшем будут рассматриваться системы, в которых либо оба партнера находятся в растворе, как в гомогенных ферментативных реакциях при взаимодействии гемоглобина с кислородом, так и при взаимодействии в растворе антигена с антителом и т.п., либо биополимер находится в составе мембраны на поверхности клетки или в препарате мембран и, следовательно, образует отдельную фазу, как в случае рецепторов или белков, осуществляющих транспорт веществ через плазматическую мембрану. Если партнеры находятся в растворе, то характеристиками количества как биополимера P, так и лиганда L могут служить концентрации. В гетерогенных системах можно говорить лишь о количестве биополимера. Характеристикой взаимодействия в общем случае служит константа ассоциации K_a, выражение для которой запишется в виде

$$n_{PL}/n_P[L] = K_a, \quad (3.5)$$

где квадратные скобки у символа компонента означают его молярную концентрацию, а n_x — количество (в молях) компонента X. Для гомогенной системы можно также написать

$$[PL]/[P][L] = K_a. \quad (3.6)$$

В дальнейшем для единообразия в написании соотношений будем использовать вторую форму записи. При этом надо иметь в виду, что для гетерогенной системы понятия концентрации биополимера и комплекса PL имеют условный характер, представляя собой отношение их количества в образце к объему исследуемой пробы.

Если речь идет о каком-либо функционально значимом узнавании, то образование комплекса не является самоцелью, но лишь сигналом к последующему действию — ответу системы. Так, узнавание ферментом субстрата приводит к превращению субстрата в продукт реакции, узнавание гормона рецептором — к возникновению определенных внутриклеточных процессов. Чаще всего именно этот ответ и является объектом регистрации. Но в ряде случаев может регистрироваться и само образование комплекса, если, например, используется лиганд, содержащий высокорадиоактивную метку, и комплекс может быть отделен от избытка лиганда за время, исключающее заметную диссоциацию комплекса. Если же измеряется какой-либо химический или биологический ответ на узнавание, то резонно предполагать, что по крайней мере в первом приближении величина, характеризующая этот ответ (например, скорость ферментативной реакции), пропорциональна количеству образовавшегося комплекса.

Выражение (3.6) можно преобразовать, введя понятия о концентрациях связанного в комплекс и свободного лиганда, соответственно $[L]_b$ (от англ. bound — связанный) и $[L]_f$ (от англ. free — свободный). В рассматриваемом случае биополимера с одним активным центром

$$[L]_b = [PL], \quad [P] = [P]_t - [L]_b, \quad (3.7)$$

где $[P]_t$ — полная концентрация биополимера в данный момент и, следовательно,

$$\frac{[L]_b}{([P]_t - [L]_b)[L]_f} = K_a. \quad (3.8)$$

Это выражение легко преобразуется к виду

$$[L]_b/[L]_f = K_a[P]_t - K_a[L]_b, \quad (3.9)$$

известному как *уравнение Скэчерда*. Согласно этому выражению должна существовать линейная зависимость между отношением $[L]_b/[L]_f$ и величиной $[L]_b$. Иными словами, если экспериментально найденные значения $[L]_b$ и $[L]_f$, полученные в нескольких экспериментах, различающихся использованными концентрациями лиганда, отложить в координатах $[L]_b/[L]_f$, $[L]_b$ (*координаты Скэчерда*), должна получиться прямая линия с тангенсом угла наклона, равным K_a.

Если биополимер содержит несколько функционирующих независимо друг от друга активных центров, то фигурирующим в предыдущих выкладках величинам [P] и [PL] следует придавать смысл концентраций свободных и занятых активных центров, а вместо величины $[P]_t$ следует использовать произведение $n[P]_t$, где n — число активных центров, приходящееся на одну частицу биополимера. Уравнение Скэчерда при этом можно записать в виде

$$([L]_b/[P]_t)/[L]_f = K_a n - K_a([L]_b/[P]_t). \quad (3.10)$$

В координатах $([L]_b/[P]_t)/[L]_f$ — $[L]_b/[P]_t$ прямая линия, на которой лежат экспериментальные точки, отсекает на оси абсцисс отрезок, равный n, т.е. этот отрезок дает число активных центров на одну частицу биополимера.

Чаще всего исследователи имеют дело с системами, содержащими значительный избыток лиганда по сравнению с узнающим его биополимером. В этом случае концентрация свободного лиганда $[L]$ практически равна внесенной в систему начальной концентрации l_0 и выражение для концентрации комплекса PL нетрудно получить в виде

$$[PL] = [P]_t K_a l_0/(1 + K_a l_0), \quad (3.11)$$

а для ответа системы R — в виде

$$R = \alpha[P]_t K_a l_0/(1 + K_a l_0) = R_{max} K_a l_0/(1 + K_a l_0), \quad (3.12)$$

где α — коэффициент пропорциональности между силой ответа и концентрацией комплекса. Видно, что зависимость имеет гиперболический характер и в сущности представляет собой уравнение, идентичное по виду и смыслу изотерме Ленгмюра.

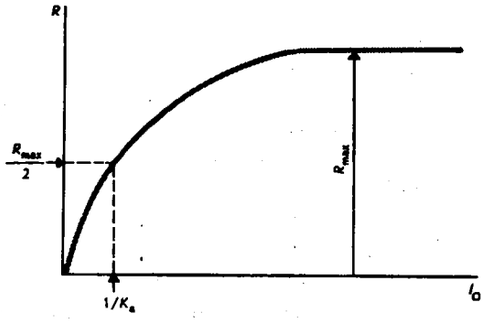


Рис. 39. Зависимость скорости ответа системы (R) от концентрации свободного лиганда (l_0)

Предельное значение ответа R_{max} соответствует полному насыщению биополимера лигандом. Половина от предельного значения достигается при концентрации лиганда, равной $1/K_a$, т.е. при концентрации, равной константе диссоциации комплекса биополимер — лиганд (рис. 39).

Эта зависимость может быть представлена в нескольких вариантах, при которых она становится линейной, т.е. в виде линейных анаморфоз, например

$$1/R = 1/R_{max} + (1/R_{max}K_a)(1/l_0) \quad (3.13)$$

или

$$R = R_{max} - (1/K_a)(R/l_0). \quad (3.14)$$

На рис. 40 представлены эти анаморфозы и значения параметров, получаемые из наклона прямых линий и отрезков, отсекаемых ими на осях координат. Такое представление экспериментальных данных может оказаться полезным для предварительной оценки параметров, характеризующих изучаемый процесс комплексообразования, которые далее могут быть получены обработкой методом наименьших квадратов. Что особенно существенно, при этом наглядно выявляется линейная зависимость или, наоборот, отклонение от нее, что свидетельствует о степени пригодности положенной в основу рассмотрения модели.

С одним и тем же биополимером в ряде случаев могут взаимодействовать несколько разных лигандов. Ниже рассмотрен случай для двух лигандов. При этом под действием второго лиганда может изменяться константа ассоциации

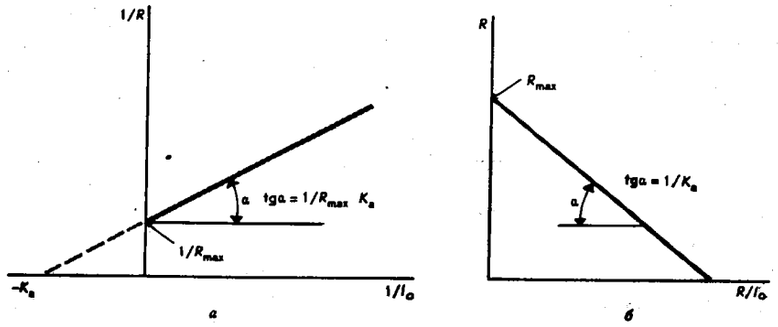


Рис. 40. Линейные анаморфозы зависимости ответа системы от начальной концентрации свободного лиганда:

а – в координатах $1/R - 1/l_0$; *б* – в координатах $R - R/l_0$

биополимера с первым лигандом и (или) химический или биологический ответ на присоединение первого лиганда. В целом это можно представить в виде схемы

$$\begin{array}{ccc} P & \overset{K_1}{\rightleftharpoons} & PL_1 \longrightarrow R \\ K_2 \Big\uparrow\Big\downarrow & & \Big\uparrow\Big\downarrow K_2\beta \\ PL_2 & \underset{K_1\beta}{\rightleftharpoons} & PL_1L_2 \longrightarrow \gamma R \end{array} \qquad (3.15)$$

где K_1 и K_2 — константы ассоциации лигандов L_1 и L_2 со свободным биополимером P; β — множитель, показывающий, во сколько раз изменяется константа ассоциации с одним из лигандов при наличии в комплексе второго лиганда; R — величина, характеризующая ответ биополимера на взаимодействие с лигандом L_1; γ — множитель, показывающий, во сколько раз изменяется ответ на присоединение L_1 при наличии в составе комплекса лиганда L_2.

Множитель β одинаков для обеих констант ассоциации, поскольку суммарная константа ассоциации P с L_1 и L_2, равная произведению констант отдельных стадий, не должна зависеть от пути образования комплекса PL_1L_2. Процессы, в которых проявляется такое взаимное влияние лигандов, называют *кооперативными*. При этом если сродство первого лиганда или вызываемый им ответ усиливаются при присоединении второго лиганда, то кооперативность считается *положительной*, а в противоположном случае — *отрицательной*. Очевидно, что в случае кооперативных процессов по крайней мере один из множителей β или γ должен отличаться от единицы. Величина ответа рассматриваемой системы запишется в виде

$$R = \alpha[PL_1] + \alpha\gamma[PL_1L_2]. \qquad (3.16)$$

Нетрудно выразить R через полную концентрацию биополимера $[P]_t$ и концентрации свободных лигандов, воспользовавшись уравнением материального баланса для всех форм полимера

$$[P]_t = [P] + [PL_1] + [PL_2] + [PL_1L_2], \qquad (3.17)$$

и выражениями для констант ассоциации

$$[PL_1]/[P][L_1] = K_1, \quad [PL_2]/[P][L_2] = K_2, \quad [PL_1L_2]/[PL_1][L_2] = \beta K_2,$$

которые позволяют исключить из (3.17) величины [P], $[PL_1]$, $[PL_2]$ и $[PL_1L_2]$. Это приводит к выражению

$$R = \alpha \frac{(K_1[L_1] + \beta\gamma K_1K_2[L_1][L_2])[P]_t}{1 + K_1[L_1] + K_2[L_2] + \beta K_1K_2[L_1][L_2]}. \qquad (3.18)$$

Частным случаем этого выражения является уравнение для скорости реакции превращения лиганда L_1, катализируемого ферментом P в присутствии второго лиганда L_2, которое в несколько измененных обозначениях приведено и проанализировано в § 6.3.

Если присутствие лиганда L_2 тормозит ответ, вызываемый взаимодействием лиганда L_1 с биополимером P, то L_2 называют ингибитором этого взаимодействия. Если L_1 является физиологически активным веществом, вызывающим определенный ответ на уровне живого организма, то согласно терминологии, принятой в фармакологии, L_2 выступает в роли антагониста по отношению к L_1.

Частным, но весьма распространенным случаем ингибирования является *конкурентное ингибирование*, при котором биополимер P может связать либо лиганд L_1, либо L_2. В простейшем случае это имеет место, если оба лиганда связываются с одним и тем же активным центром биополимера, т.е. конкурируют между собой за связывание с этим центром. В схеме (3.15) этому соответствует равенство $\beta = 0$. Выражение (3.18) при этом преобразуется к виду

$$R = \alpha \frac{K_1[L_1][P]_t}{1 + K_1[L_1] + K_2[L_2]}. \qquad (3.19)$$

Следует отметить, что в схеме (3.15) никак не оговорено, что биополимер P построен из одной полимерной цепочки. Это может быть и комплекс из нескольких полимерных молекул, причем активные центры, связывающие L_1 и L_2, могут находиться на разных субъединицах. В этом случае, однако, кооперативный характер взаимодействия предполагает, что присутствие лиганда L_2 на одной из субъединиц так влияет на ее конформацию, что это передается на контактирующую с ней субъединицу, связывающую лиганд L_1, в результате чего изменяется характер ее взаимодействия с L_1.

Второй важный случай кооперативных взаимодействий проявляется в системах, построенных из нескольких субъединиц, содержащих однотипные центры связывания лиганда L. В качестве детально изученного примера можно привести уже неоднократно упоминавшийся гемоглобин, содержащий четыре остатка гема, по одному на каждой из двух α- и двух β-субъединиц, и тем самым способный связывать до четырех молекул O_2. Важной особенностью этой структуры является тот факт, что присоединение O_2 к одной из субъединиц вызывает конформационное изменение не только в ней самой, но и в контактирующих с ней субъединицах, причем в результате этих изменений повышается их сродство к кислороду. Это существенно изменяет вид зависимости степени насыщения кислородом от его парциального давления по сравнению с гиперболической зависимостью, описываемой уравнением (3.12). Важно, что при этом зависимость становится значительно более благоприятной для выполнения гемоглобином его основной биологической функции — переноса кислорода от легких к тканям живого организма.

Прежде чем пояснить последнее утверждение, следует рассмотреть упрощен-

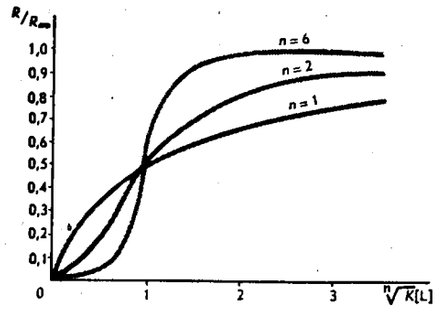


Рис. 41. Зависимость, описываемая уравнением Хилла в безразмерных координатах R/R_∞ — $-\sqrt[n]{K}$ [L] для случаев с различным числом активных центров ($n = 1$, $n = 2$, $n = 6$)

ную модель кооперативного связывания лиганда по нескольким взаимодействующим между собой центрам, которая положена в основу широко используемого уравнения Хилла. Эта модель предполагает, что связывание лиганда с одной субъединицей настолько повышает сродство к нему остальных субъединиц, что это приводит автоматически к полному насыщению всего биополимера лигандом. Следовательно, согласно этой модели, в системе в существенных концентрациях присутствуют либо свободный полимер P, либо полимер с полностью занятыми активными центрами PL_n, где n — число активных центров (число субъединиц, если на каждой находится по одному активному центру). Иными словами, в модели учитывается одно-единственное равновесие

$$P + nL \rightleftharpoons PL_n \tag{3.20}$$

которое характеризуется константой ассоциации

$$[PL_n]/[P][L]^n = K \tag{3.21}$$

(размерность K $[C]^{-n}$).

Выражение для концентрации комплекса PL_n или для пропорциональной этой концентрации величины ответа запишутся в виде

$$[PL_n] = \frac{K[L]^n[P]_t}{1 + K[L]^n}; \tag{3.22}$$

$$R = \alpha \frac{K[L]^n[P]_t}{1 + K[L]^n} = \frac{K[L]^n R_\infty}{1 + K[L]^n}, \tag{3.23}$$

где R_∞ — предельная величина ответа при $[L] \longrightarrow \infty$.

Полученные зависимости для $[PL_n]$ и R от концентрации лиганда называют *уравнениями Хилла*. В качестве иллюстрации на рис. 41 приведены в безразмерных координатах R/R_∞, $\sqrt[n]{K}$ [L] зависимости, описываемые уравнением Хилла при $n = 1$, $n = 2$ и $n = 6$. Видно, что чем выше n, тем более резко происходит переход от практически полного отсутствия ответа к максимально возможному его значению. В случае $n = 1$ для того, чтобы ответ изменился от 5 до 95% от максимального значения величины, необходимо изменение концентрации в 360 раз, при $n = 2$ — в 19 раз, при $n = 6$ — всего в 2,7 раза.

Для функционирования гемоглобина в качестве переносчика кислорода желателен как можно более высокий уровень его насыщения кислородом в легких и вместе с тем как можно более полная диссоциация комплекса гемоглобин — O_2 в тканях, где в результате окислительных процессов, потребляющих кислород, его парциальное давление снижено. Это означает, что уменьшение парциального давления кислорода должно сопровождаться достаточно резким снижением равновесной степени насыщения им гемоглобина. Как следует из уравнения Хилла и из рис. 41, если предположить, что степень насыщения кислородом является ответом системы, ее возрастанию как раз и способствует увеличение числа кооперативно функционирующих субъединиц.

Уравнение Хилла может быть легко преобразовано к виду

$$\lg \frac{R}{R_\infty - R} = n \lg [L] - \lg K. \tag{3.24}$$

Согласно этому выражению зависимость ответа от концентрации лиганда в координатах $\lg\{R/(R_\infty - R)\}$, $\lg[L]$ должна быть линейной, причем тангенс угла наклона ее должен быть равен n. Поскольку модель является упрощенной, то и реальная зависимость, получаемая из эксперимента, как правило, не является линейной. Однако средний наклон этой зависимости в известной мере дает представление о степени кооперативности рассматриваемой системы.

Для количественного рассмотрения подобных процессов необходим анализ многоступенчатых равновесий. В качестве иллюстрации общего подхода ниже приведен анализ двусубъединичной системы. Если обе субъединицы идентичны, то ступенчатое связывание лиганда описывается константами равновесия

$$[PL]/[P][L] = K_1, \quad [PL_2]/[PL][L] = K_2.$$

С учетом уравнения материального баланса для всех трех форм биополимера — P, PL и PL_2 — выражения для концентраций PL и PL_2 запишутся в виде

$$[PL] = \frac{K_1[L][P]_t}{1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2}, \tag{3.25}$$

$$[PL_2] = \frac{K_1K_2[L]^2[P]_t}{1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2}, \tag{3.26}$$

а величина ответа — в виде

$$R = \frac{(\alpha_1K_1[L] + \alpha_2K_1K_2[L]^2)[P]_t}{1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2}, \tag{3.27}$$

где α_1 и α_2 — коэффициенты пропорциональности между величинами ответа и концентрациями PL и PL_2 соответственно.

По аналогии с первым типом кооперативных взаимодействий можно ввести параметры β и γ, характеризующие влияние присутствия на димере одной молекулы лиганда на сродство ко второй молекуле того же лиганда и на величину ответа. При этом следует учесть, что в отсутствие кооперативности отношение констант ассоциации должно быть равно $K_1/K_2 = 4$, так как присоединение лиганда к P должно идти в два раза быстрее, чем к PL, поскольку идет по двум центрам, а диссоциация PL_2 должна идти вдвое быстрее, чем PL, поскольку может диссоциировать любая из двух молекул L. Поэтому вместо констант ассоциации K_1 и K_2 можно ввести константы $2K$ и $\beta K/2$. Вместо коэффициентов пропорциональности α_1 и α_2 следует ввести коэффициенты α и $\gamma\alpha$. Выражения для степени заполнения биополимера лигандом и для величины ответа в этих обозначениях запишутся в виде

$$([PL] + 2[PL_2])/[P]_t = [P]_t \frac{2K[L] + 2\beta K^2[L]^2}{\ldots} \tag{3.28}$$

$$R = \alpha[P]_t \frac{2K[L] + \beta\gamma K^2[L]^2}{1 + 2K[L] + K^2[L]^2}. \qquad (3.29)$$

Такой подход может быть без труда распространен на биополимеры с произвольным числом субъединиц, но при этом будет соответственно возрастать число параметров, необходимых для описания равновесия и величины ответа. Это затрудняет использование такого строгого подхода для систем с большим числом субъединиц, а в некоторых случаях практически полностью его обесценивает.

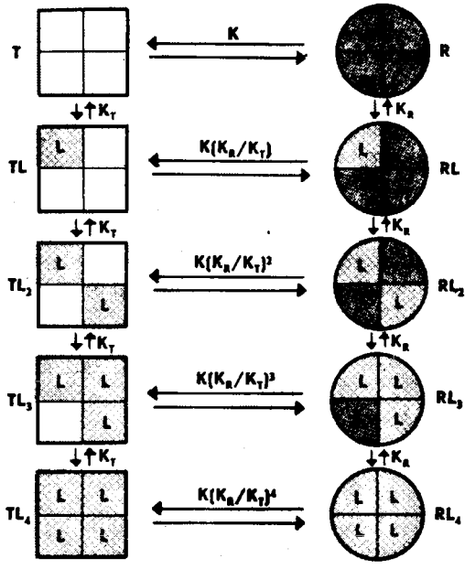


Рис. 42. Схематическое изображение модели согласованных переходов для биополимера, состоящего из четырех субъединиц

Промежуточное положение между весьма упрощенным уравнением Хилла и строгим рассмотрением многоступенчатых равновесий занимает модель, предложенная Моно, Уайменом и Шанже, известная как симметричная модель с согласованным переходом. Эта модель учитывает уже упоминавшееся в § 3.9 положение, что конформационное изменение, вызываемое присоединением лиганда, происходит в результате его влияния на предсуществующее равновесие между двумя формами биополимера. Предполагается, что одна из них, форма T (от англ. tight — плотная), обладает более низким сродством к лиганду, чем форма R (релаксированная).

В основу модели положен постулат о сохранении симметрии структуры биополимера при конформационном переходе, т.е. предположение, что в каждой данной частице биополимера все субъединицы находятся либо в форме T, либо в форме R. В этом случае поведение системы описывается всего тремя параметрами — константами соответствующих равновесий K, K_T и K_R, выражения для которых (3.1), (3.2), (3.3) приведены в предыдущем параграфе. Читателю предоставляется возможность самостоятельно вывести выражение, описывающее зависимость степени заполнения биополимера лигандом от концентрации свободного лиганда, которое имеет вид

$$\left[\sum_{x=1}^{n} [TL]_x + \sum_{x=1}^{n} [RL]_x\right] / [P]_t =$$

$$= \frac{KK_T[L](1 + K_T[L])^{n-1} + K_R[L](1 + K_R[L])^{n-1}}{K(1 + K_T[L])^n + (1 + K_R[L])^n}. \qquad (3.30)$$

Для наглядности на рис. 42 представлена схема, положенная в основу симмет-

Задачи

3.1. Пользуясь структурой инсулина, приведенной на рис. 3, и ориентировочными значениями pK аминокислотных остатков, приведенными в табл. 3.1, оцените заряд инсулина при значениях pH, 3, 7 и 10.

3.2. Найдите число гидрофобных остатков отдельно в A- и B-цепях инсулина.

3.3. В состав белков плазмы крови входит белок аполипопротеид, ответственный за транспорт водонерастворимых липидов. В полипептидной цепи этого белка содержится участок, способный сворачиваться в α-спираль:

—Val—Ser—Glu—Tyr—Phe—Gln—Thr—Val—Thr—Asp—Tyr—Gly—Lys—Asp—Leu—Met—
—Glu—Lys—Val—Lys—

Изобразите распределение боковых радикалов аминокислот относительно поверхности цилиндра, описывающего α-спираль. Какое значение может иметь это распределение для функции белка?

3.4. Додекапептид аминокислотной последовательности

$—H_3N^+—Ala_1—Val_2—Ala_3—Ala_4—Ala_5—Val_6—Ala_7—Val_8—Leu_9—Ala_{10}—Ala_{11}—$
$—Val_{12}—COO^-$

имеет структуру α-спирали. Как изменится вторичная структура данного пептида, если сделать следующие замены аминокислот:

1) Ala_3 на Leu, Val_6 на Ile;
2) Ala_3 на Trp;
3) Ala_3 на Trp, Val_6 на Trp;
4) Val_2 на Arg, Val_6 на Lys;
5) Val_2 на Lys, Val_6 на Glu?

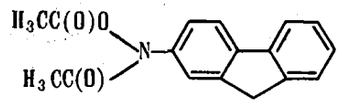
3.5. Определена первичная структура тРНК *E.coli*, специфичная к тирозину:

5′pGGUGGGGUUCCCGAGCGmeGGCCAAAGGGA—GCAGACUGUGUAAAψCUGCCGCAUCAUCGACUUCGAA
GGTψCGAAUCCUUCCCCCACCACCA—OH3′*

Нарисуйте структуру этой т-РНК в виде «клеверного листа». Обозначения минорных нуклеотидов те же, что и на рис. 28. В чем наиболее существенное отличие пространственной структуры тРНК, специфичной к тирозину, от тРНК, специфичной к фенилаланину, данной на рис. 28?

3.6. Для исследования влияния химической модификации гетероциклов на стабильность дуплекса нуклеиновых кислот синтезировали декаолигонуклеотид pCpTpGpApTpTpApCpGpA, комплементарный участку одноцепочечной ДНК. Декаолигонуклеотид перед образованием дуплекса подвергали модификации различными химическими агентами:

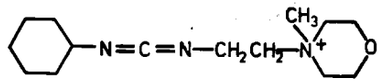
1. В водно-спиртовом растворе при pH 7 и 37°C проводили модификацию N-ацетокси-N-ацетил-2-аминофлуореном



*Для краткости изображения символ «p» в формуле опущен

который реагирует с гуанином по C — 8 гетероцикла. Напишите формулу продукта модификации. Как эта модификация повлияет на стабильность образуемого дуплекса?

2. При обработке нуклеиновых кислот водорастворимым карбодиимидом [N-циклогексил-N′-(метилморфолиний)-этилкарбодиимид]



идет электрофильная атака атома C карбодиимидной группы на атом N группировки —CO—NH—. Какие гетероциклы в данном декануклеотиде будут модифицироваться? Напишите формулы модифицированных нуклеотидов. Как изменится стабильность дуплекса?

3. При обработке цитозина аминами в присутствии гидросульфита происходит реакция переаминирования. Как будет влиять на стабильность дуплекса переаминирование однозамещенным (NH_2R) и двузамещенным (NHR_2) аминами? Изобразите комплементарные пары модифицированного цитозина с гуанином.

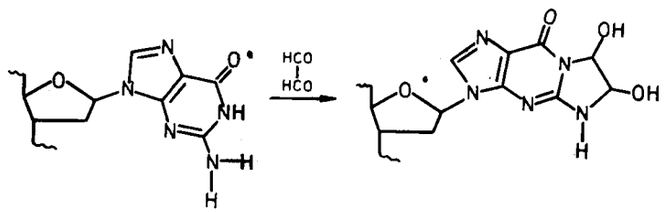
4. При синтезе данного декануклеотида использовали 2-аминопроизводное аденина. Как это может повлиять на стабильность образуемого дуплекса? Изобразите комплементарную пару модифицированного аденина с тимином.

3.7. Двуцепочечная кольцевая ДНК содержит в своей структуре фрагмент такой последовательности:

5′ — pGpCpTpApGpTpTpCpApCpApCpTpGpApApCpApApTpT — 3′

3′ — CpGpApTpCpApApGpTpGpTpGpApCpTpTpGpTpTpApApAp — 5′

При обработке такой кольцевой структуры бромацетальдегидом, реагирующим с аденином по реакции (VII.2), и глиоксалем, реагирующим с гуанином по реакции



модификации гетероциклов не наблюдается. При переводе структуры в сверхспирализованное состояние наблюдается модификация 11-аденина и 10′- и 12′-гуанинов. Объясните причину модификации и нарисуйте возможную третичную структуру фрагмента.

3.8. Взаимодействие аргинил-тРНК-синтетазы из *E.coli* с субстратом аргинином, содержащим радиоактивную метку [^{14}C]-аргинина, исследовали с использованием метода равновесного диализа. Диализ проводили в кювете, разделенной на два равных по объему отсека целлюлозной мембраной, проницаемой для аргинина и непроницаемой для фермента. В кювету заливали раствор субстрата различной концентрации в стандартном буфере. Далее в один из отсеков кюветы вносили раствор фермента в стандартном буфере. Концентрация фермента во всех опытах была постоянной, равной 6,5 мкМ. После проведения диализа и установления равновесия определяли концентрацию аргинина в отсеке, не содержащем фермент.

Получены следующие экспериментальные данные:

№ опыта	1	2	3	4	5
Концентрация внесенного [^{14}C]-аргинина, мкМ	38,5	57,9	156,3	295,5	395,0
Концентрация [^{14}C]-аргинина в отсеке, не содержащем фермента, мкМ	18,5	27,9	76,3	145,5	195

Сколько [^{14}C]-аргинина связалось с аргинил-тРНК-синтетазой? Представьте результаты в координатах Скэчерда и вычислите значения константы ассоциации и число центров связывания.

3.9. Как правило, не все части узнаваемого лиганда в равной мере существенны для его связывания с биополимером, поэтому можно сконструировать аналог лиганда, содержащий химически реакционноспособные группы. В этом случае за образованием специфического комплекса PX биополимера P с реакционноспособным аналогом лиганда X может последовать химическая реакция между аналогом и какой-либо группой биополимера часто с образованием ковалентной связи. Поскольку это происходит в результате сближения реакционноспособной группы аналога и модифицируемого фрагмента биополимера, т.е. за счет сродства (аффинности) биополимера к аналогу, такая модификация названа аффинной модификацией.

Напишите простейшую схему аффинной модификации.

Сделав допущения, что а) концентрация комплекса PX является квазиравновесной, т.е. по ходу всего процесса выполняется соотношение

$$\frac{[P][X]}{[PX]} = K_x,$$

где K_x — константа диссоциации комплекса PX; б) реагент введен в большом избытке по отношению к биополимеру, т.е. $[X]_0 \gg [P]_0$, выведите кинетическое уравнение для накопления продукта модификации PZ. Как будет выглядеть зависимость начальной скорости модификации от концентрации реагента?

ГЛАВА 4

ФЕРМЕНТЫ

В настоящее время число различных известных реакций, катализируемых ферментами, составляет около двух тысяч и число их непрерывно возрастает. Для того чтобы ориентироваться в этом множестве биохимических превращений, нужна некоторая систематика. Она создана Международным союзом по биохимии (International Union of Biochemisry, IUB) и рекомендована к повсеместному использованию. Согласно этой классификации все ферменты подразделяют на шесть *классов*.

Каждый класс — на *подклассы*, а каждый подкласс — на *подподклассы*. Все они имеют свои номера. В пределах подподкласса каждый фермент имеет свой порядковый номер. Таким образом, фермент характеризуется четырьмя числами: номером класса, подкласса, подподкласса и порядковым номером фермента в подподклассе.

Кроме того, рекомендации IUB касаются и номенклатуры ферментов. Создана применимая для большинства ферментов систематическая номенклатура. Допускается использование и других упрощенных названий, причем при наличии нескольких исторически сложившихся названий выделяется одно, рекомендуемое для использования. В научных публикациях при первом упоминании о ферменте принято приводить его систематическое название и шифр по классификации, а в дальнейшем пользоваться рекомендованным упрощенным названием.

В данном курсе в качестве приложения приведена выборка из полного перечня ферментов, в которой представлены шифры и рекомендованные упрощенные названия для всех ферментов, упоминаемых в тексте, а также некоторые дополнительные сведения об этих ферментах.

Как уже кратко говорилось § 2.5, в живой природе существуют специальные вещества, циклически функционирующие в определенных системах ферментативных реакций.

В качестве примера такого соединения приводился никотинамидадениндинуклеотид, который в своей окисленной форме выступает в качестве окислителя большого числа спиртов и альдегидов, после чего восстановленная форма окисляется главным образом путем передачи электронов на кислород в специальной цепи переноса электронов. Такие специализированные соединения принято называть *коферментами*.

По ходу описания отдельных классов реакций будут упомянуты важнейшие коферменты, равно как и все главные типы кофакторов, характерные для соответствующих групп ферментов.

Говоря о классификации ферментов, следует подчеркнуть, что ферменты классифицируются не как индивидуальные вещества, а как катализаторы, определенных химических превращений или групп химических превращений. Ферменты, выделенные из разных биологических источников и катализирующие идентичные реакции, могут довольно существенно отличаться по своей первичной структуре, как это было продемонстрировано в § 2.1 на примере панкреатических рибонуклеаз из разных видов млекопитающих. Тем не менее все они в перечне классифицированных ферментов фигурируют под одним шифром.

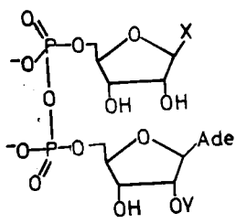
4.1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

К первому классу ферментов относятся практически все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные превращения. Эти ферменты называются *оксидоредуктазами*. Их систематическое название складывается из названия восстановителя (донора электронов), окислителя (акцептора электронов) и названия класса. Например фермент, катализирующий окисление этанола до ацетальдегида с использованием NAD^+ в качестве окислителя, по систематической номенклатуре называют алкоголь: NAD^+-оксидоредуктаза. Следует сразу же подчеркнуть, что квалификация одного из участников реакции как донора, а другого как акцептора электронов в ряде случаев имеет условный характер, поскольку реакция может сопровождаться небольшим изменением энергии Гиббса и в зависимости от условий протекать в живых системах в одном или другом направлении. Например, при поступлении этанола в живой организм в аэробных условиях реакция протекает в сторону образования ацетальдегида, а в условиях спиртового брожения обеспечивает превращение образующегося из глюкозы ацетальдегида до этанола.

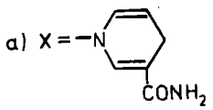
Подклассы оксидоредуктаз по большей части определяются типами соединений, выступающих в качестве доноров электронов. Ферменты подкласса 1 катализируют окисление гидроксигрупп до карбонильных, подкласса 2 – окисление карбонильных групп до карбоксильных, подкласса 3 – окисление групп $>CH—CH<$ до $>C=C<$, подкласса 4 – окисление групп $CH—NH_2$, приводящее обычно к образованию карбонильных групп и иона NH_4^+, подкласса 5 – окисление групп $CH—NH$, подкласса 8 – действуют на содержащие серу группы доноров, подкласса 10 – на дифенолы и родственные группы доноров и т. д.

В отдельные подклассы выделены ферменты (оксигеназы), катализирующие реакции, которые приводят к введению в окисляемое вещество одного атома кислорода — подкласс 14 (монооксигеназы) — или двух атомов кислорода — подкласс 13 (диоксигеназы) — из молекулы O_2.

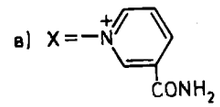
В рамках этих подклассов подподклассы определяются типами соединений, рассматриваемых в качестве акцепторов электронов (окислителей). К подподклассу 1 относят ферменты, катализирующие реакции окисления — восстановления с участием никотинамидадениндинуклеотида или его близкого аналога, у которого 2′-гидроксигруппа аденилатного фрагмента фосфорилирована, – *никотинамидадениндинуклеотидфосфата* (65), который в окисленной и восстановленной форме записывается соответственно как NADP$^+$ и NADPH.



65

а) X =  Y = H NAD · H

б) X = То же Y = PO_3^{2-} NADP · H

в) X =  Y = H NAD^+

г) X = То же Y = PO_3^{2-} $NADP^+$

Ферменты, использующие в качестве окислителя NAD^+ или $NADP^+$, принято называть *дегидрогеназами*, поскольку они катализируют реакцию передачи двух атомов H. Например, упомянутый выше фермент, катализирующий окисление спиртов по реакции

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NAD\cdot H + H^+ \qquad (IV.1)$$

рекомендуется называть *алкоголь дегидрогеназой*. Согласно сказанному этот фермент относится к подклассу 1.1.1., и поскольку он является первым ферментом в этом подклассе, то его шифр записывается как КФ 1.1.1.1 (англ. EC 1.1.1.1, где EC – сокращение от Enzyme Classification).

Несмотря на то, что реакции, катализируемые ферментами, относящимися к подподклассу 1 оксидоредуктаз, как правило, обратимы, их биологическое значение в большинстве случаев связано преимущественно с протеканием реакции в определенном направлении. При этом отчетливо проявляется такая закономерность: если биологически значимо окисление органического субстрата, то в реакции в качестве окислителя чаще всего участвует NAD^+. Если же реакция этого подподкласса имеет значение для восстановления какого-либо органического соединения, то чаще всего восстановителем является $NADP\cdot H$.

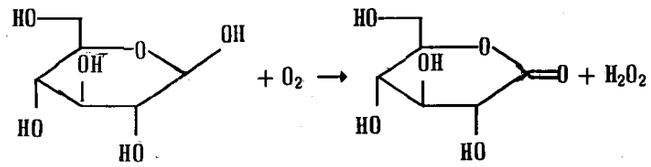
Число известных биохимических процессов окисления спиртовых групп до карбонильных с помощью никотинамидных коферментов, а следовательно, и число различных ферментов подподклассов 1.1.1 превышают две сотни. Кроме того, никотинамидные коферменты участвуют в нескольких десятках различных реакций окисления карбонильных групп до карбоксильных. При этом некоторые реакции окисления альдегидных групп протекают сопряженно с образованием тиоэфирных групп или смешанных ангидридов карбоновой и фосфорной кислот. Например, важный промежуточный этап окисления глюкозы – это окисление глицеральдегид-3-фосфата, которое протекает по реакции

$$^{2-}O_3POCH_2CHOHC(=O)H + NAD^+ + HPO_4^{2-} \rightleftharpoons {}^{2-}O_3POCH_2CHOHC(=O)OPO_3^{2-} + NAD\cdot H + H^+ \qquad (IV.2)$$

и приводит к образованию смешанного ангидрида 3-фосфоглицериновой и ортофосфорной кислот — 1,3-дифосфоглицерата.

Такой характер окисления имеет важное биоэнергетическое значение, поскольку остаток фосфорной кислоты, образующий ангидридную связь, может быть перенесен от 1,3-дифосфоглицерата на АДФ с образованием АТФ. Фермент, катализирующий реакцию (IV.2), называют *глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой* (КФ 1.2.1.12).

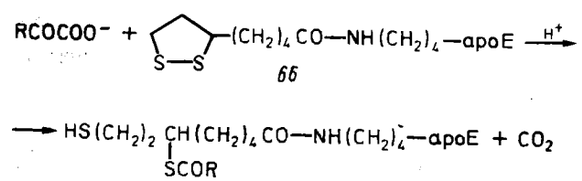
Аналогичным образом при выделении подподклассов по природе окислителя к подподклассу 2 относят ферменты, катализирующие окисление цитохромом *c* в окисленной форме (феррицитохромом *c*), к подподклассу 3 – катализирующие окисление молекулярным кислородом, к подподклассу 4 - катализирующие окисление дисульфидами, и т. д. Например, *глюкозооксидаза*, катализирующая окисление полуацетальной OH-группы β-D-глюкозы до карбонильной по уравнению



(IV.3)

относится к первому подклассу и третьему подподклассу (КФ 1.1.3.4).

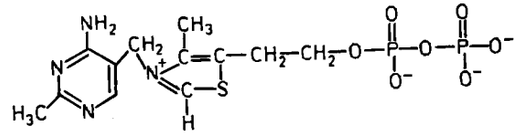
Особого рассмотрения заслуживает подподкласс оксидоредуктаз 1.2.4, к которому относится небольшое число исключительно важных ферментов, катализирующих окислительное декарбоксилировние α-кетокислот остатком *липоамида* (66), связанного амидной связью через ε-аминогруппу остатка лизина с апоферментом трансацетилазой (см.§ 4.2):



66

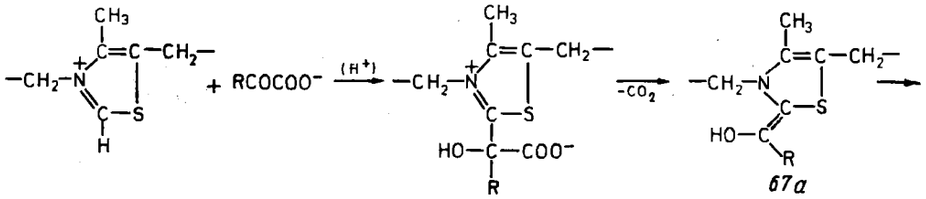
(IV.4)

Кофактором этих ферментов является *тиаминпирофосфат* (67):

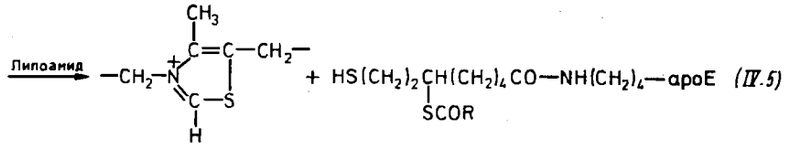


67

Схему превращений, происходящих в активном центре фермента с участием

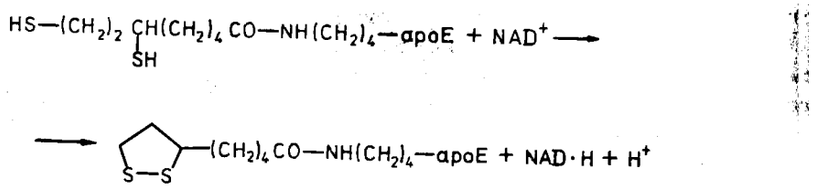


67а



(IV.5)

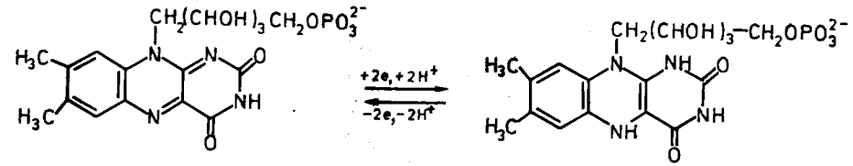
(изображены лишь непосредственно участвующие в превращениях тиазольное кольцо и примыкающие к нему радикалы). За этим процессом непосредственно следует перенос образовавшегося ацильного остатка на SH-группу специального кофермента, называемого коферментом А, который описан в следующем параграфе. Образовавшийся дигидролипоамид окисляется с помощью NAD^+ третьим ферментом, участвующим в окислительном декарбоксилировании, – *дигидролипоамид дегидрогеназой* (КФ 1.8.1.4), катализирующей реакцию



Например, если $R = CH_3$, то фермент катализирует окислительное декарбоксилирование пирувата (соли пировиноградной кислоты) с образованием ацетильного производного дигидролипоамида. Этот процесс является важным этапом аэробной деструкции глюкозы (см. § 8.2). Рекомендуемое название фермента – *пируватдегидрогеназа*, а систематическое название, которое должно отражать и основную, и сопутствующие реакции, – пируват: липоамид оксидоредуктаза (декарбоксилирующая и ацетилирующая акцептор).

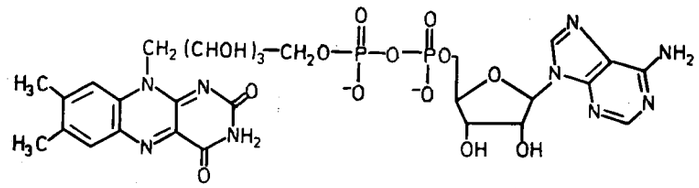
Названия представителей некоторых других подклассов оксидоредуктаз, встречающихся при дальнейшем изложении, можно найти в приложении. Ниже лишь кратко рассмотрены некоторые ферменты, катализирующие окисление с участием пероксида водорода и молекулярного кислорода.

Прежде чем приступить к описанию этих ферментов, следует отметить, что для многих из них характерно участие в качестве кофакторов сложных органических молекул, в первую очередь гема или флавиновых кофакторов. О гемопротеидах уже шла речь в § 1.1. *Флавопротеиды* содержат в качестве кофактора *флавинмононуклеотид* (68 а, б), сокращенно FMN, или *флавинадениндинуклеотид* (69), сокращенно FAD:



68а

68б



69

Оба кофактора, как видно на примере FMN, могут присутствовать как в окисленной (68 а), так и в восстановленной (68 б) формах, и их роль сводится в первую очередь к переносу электронов от восстановителя к окислителю. Примером флавопротеида является упоминавшаяся выше глюкозооксидаза, содержащая в качестве кофактора флавинадениндинуклеотид.

Число известных ферментативных превращений с участием H_2O_2 в качестве окислителя невелико. Все соответствующие ферменты выделены в отдельный, 11-й, подкласс с единственным подподклассом 1.11.1. В их число входят упоминавшаяся в § 1.1. каталаза (КФ 1.11.1.6) и *пероксидаза* (КФ 1.11.1.7, обычно выделяется из хрена), катализирующая окисление пероксидом водорода разнообразных органических субстратов. Оба фермента являются гемопротеидами.

Ферменты, катализирующие превращения с участием молекулярного кислорода, разделяются на три основные группы: *оксидазы*, *монооксигеназы и диоксигеназы*. К оксидазам относят ферменты, катализирующие процессы, в результате которых O_2 восстанавливается до H_2O_2 или до двух молекул воды. Примерами таких ферментов могут служить глюкозооксидаза и цитохром *c* оксидаза, катализирующая окисление ферроцитохрома *c* до феррицитохрома по реакции

$$4\ \text{Цитохром } c\ \text{Fe (II)} + 4H^+ + O_2 \rightarrow 4\ \text{Цитохром } c\ \text{Fe (III)} + 2H_2O \quad \text{(IV.6)}$$

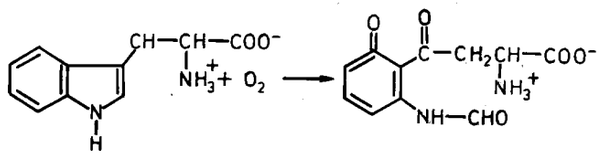
К моноксигеназам относят ферменты, катализирующие окисление органических соединений, приводящее к включению одного из атомов кислорода молекулы O_2 в молекулы этих соединений, и восстановление второго атома кислорода до воды. Для большого числа реакций, катализируемых оксигеназами, характерно участие двух доноров, один из которых включает в свой состав атом кислорода, а второй является донором водорода при образовании молекулы воды. Природа второго вспомогательного донора может быть различной. Большое число монооксигеназ используют в качестве донора NADPH. В этом случае суммарное уравнение реакции можно записать в виде

$$RH + NADP \cdot H + H^+ + O_2 \longrightarrow ROH + NADP^+ + H_2O \qquad (IV.7)$$

К монооксигеназам относится важная группа ферментов, известных под общим названием *цитохромы P450*. Эти ферменты являются одновременно гемо- и флавопротеидами, причем флавиновые нуклеотиды выступают в качестве второго донора. Своим названием они обязаны тому обстоятельству, что вследствие специфики их строения стабильный комплекс, образуемый CO с восстановленной формой гема в составе цитохрома, имеет максимум поглощения при 450 нм, в то время как для гемоглобина и миоглобина аналогичный комплекс имеет максимум поглощения при 420 нм. Упомянутая специфика строения заключается в том, что у цитохромов *P450* стабильным оксиальным лигандом иона железа является SH-группа остатка цистеина апофермента. Цитохромы *P450* в печени осуществляют гидроксилирование чуждых организму липофильных соединений, образующихся в качестве побочных продуктов или попадающих в организм извне (такие вещества объединяют общим названием *ксенобиотики*, от греч. xenos – чужой).

Образование гидроксигрупп повышает гидрофильность этих веществ и облегчает их последующий вывод из организма. Кроме того, специальные цитохромы *P450* принимают участие в отдельных этапах превращения холестерина и стероидных гормонов. Для циклической работы цитохромов *P450* необходимо участие еще одного фермента – NADPH: *цитохром P450 редуктазы*, которая катализирует восстановление связанного с белком флавинового нуклеотида с помощью NADPH. Наличие в живых организмах высокоэффективной системы цитохрома *P450* приводит в ряде случаев к нежелательным последствиям: сокращает время пребывания в организме человека лекарственных препаратов и тем самым снижает их терапевтический эффект, делает сельскохозяйственных вредителей устойчивыми к пестицидам.

Диоксигеназы катализируют превращения, в ходе которых оба атома молекулы O_2 включаются в состав окисляемого субстрата. Например, деструкция триптофана начинается с реакции образования формилкинуренина



(IV.8)

в состав которого входят оба атома кислорода молекулы O_2. Фермент, катализирующий эту реакцию, является гемопротеидом и называется *триптофан 2,3-диоксигеназой* (L — триптофан: кислород 2,3-оксидоредуктаза дециклизующая КФ 1.13.11.11).

В заключение следует упомянуть фермент, катализирующий диспропорционирование свободного радикала $H\dot{O}_2$, образующегося в некоторых реакциях с участием O_2 и являющегося очень сильным окислителем. Фермент называют *супероксиддисмутазой* (КФ 1.15.1.1). Он катализирует реакцию

$$H\dot{O}_2 + H\dot{O}_2 \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Фермент является металлопротеидом и в зависимости от источника содержит

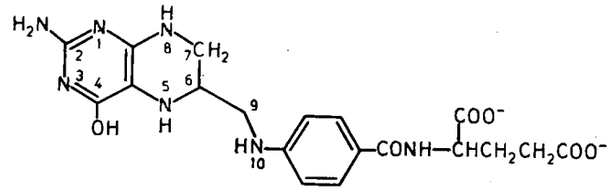
4.2. ТРАНСФЕРАЗЫ

К классу *трансфераз* относят ферменты, катализирующие различные превращения, представляющие собой перенос радикала от молекулы-донора к молекуле-акцептору и не являющиеся процессом гидролиза. В общем виде эти превращения можно записать как

$$XY + Z \rightleftharpoons X + YZ \; (X,Z \neq H_2O \text{ или } OH^-) \qquad (IV.9)$$

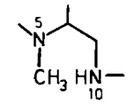
Систематическое название ферментов, катализирующих такие превращения, XY : Z Y-трансферазы. Например, фосфофруктокиназа (см. § 6.3), катализирующая превращение (VI. 3), по систематической номенклатуре является АТФ: фруктозо-1-фосфат фосфотрансферазой. Разделение на подклассы определяется природой переносимых групп.

К первому подклассу относят ферменты, катализирующие реакции переноса одноуглеродных остатков. В этих процессах ключевое значение имеют два сложных органических соединения — *тетрагидрофолат* (70) и S-аденозилметионин:

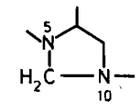


70

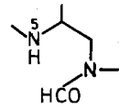
Тетрагидрофолат (tetrahydrofolate, THF) может присоединять одноуглеродные фрагменты по атомам азота N5 и N10 или в виде мостика, связывающего эти атомы. Атом углерода переносимого фрагмента может находиться в степени окисления 1, 2 и 3. Ниже представлены известные формы производных тетрагидрофолата, причем изображены лишь узлы производных, содержащие одноуглеродный фрагмент и связывающие его атомы (70 а, б, в, г, д):



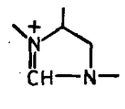
N5 – метилтетрагидрофолат
N5 – CH_3–THF
70а



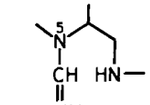
N5,N10 – метилентетрагидрофолат
N5,N10 – CH_2–THF
70б



N10 – формилтетрагидрофолат
N10–HCO–THF
70в

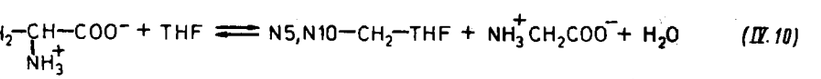


N5,N10 – метенилтетрагидрофолат
N5,N10–CH–THF
70г



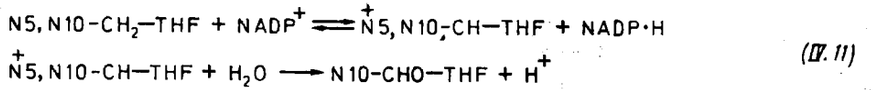
N5 формиминотетрагидрофолат
N5–CHNH–THF
70д

Главным процессом, в результате которого тетрагидрофолат «заряжается» одноуглеродным фрагментом, является его реакция с серином, катализируемая *серин гидроксиметилтрансферазой*:



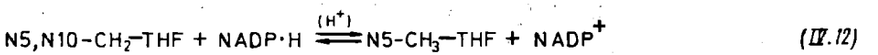
(IV.10)

Систематическое название этого фермента в соответствии со сказанным в начале параграфа: серин тетрагидрофолат гидроксиметилтрансфераза (К.Ф. 2.1.2.1). Это производное, содержащее одноуглеродный фрагмент со степенью окисления атома С, равной двум, может либо подвергаться окислению до N5, N10-метенилтетрагидрофолата, который, в свою очередь, дает путем гидролиза N10-формилтетрагидрофолат:



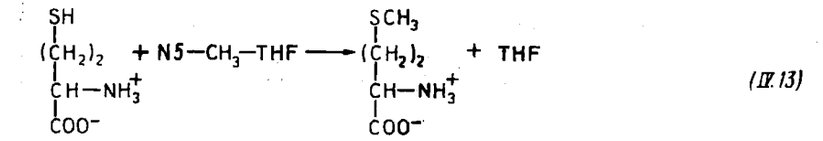
(IV.11)

либо восстанавливаться до N5-метилтетрагидрофолата по реакции



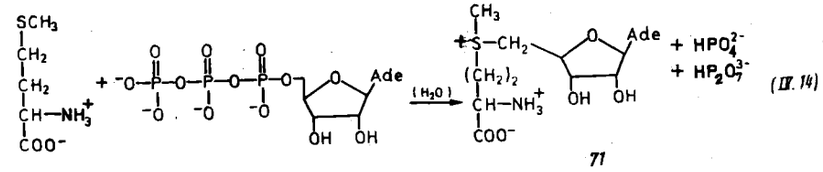
(IV.12)

Приведенные окислительно-восстановительные превращения катализируются соответственно *метилентетрагидрофолат дегидрогеназой* (КФ 1.5.1.5) и *метилентетрагидрофолат редуктазой* (КФ 1.5.1.20). Формильное и метенильное производные используются в качестве донора формильных фрагментов в первую очередь в цепи превращений, ведущих к образованию пуринового кольца при биосинтезе пуриновых нуклеотидов (см. § 9.6). Метильное производное в основном направляется на метилирование *гомоцистеина* с образованием метионина:



(IV.13)

Естественно, что часть образующегося метионина по мере необходимости используется живым организмом для синтеза белков. Однако значительная его часть превращается по реакции



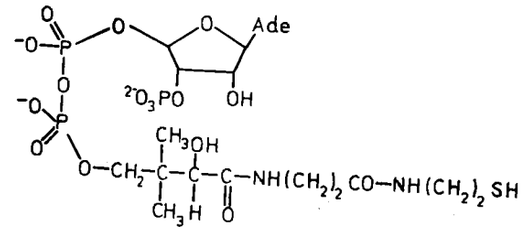
(IV.14)

71

в S-*аденозилметионин* (71) — главный метилирующий реагент в клетках, участвующий в десятках известных и, вероятно, в еще большем числе пока не выявленных процессов метилирования с помощью ферментов метилтрасфераз. В этих

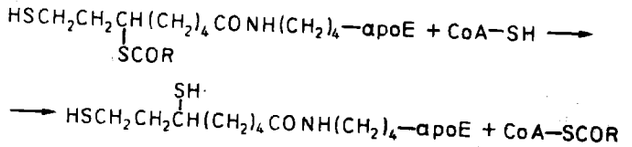
аденозилметионин превращается в S-аденозилгомоцистеин. Последний может гидролизоваться до аденозина и гомоцистеина, который снова образует метионин в результате метилирования 5-метилтетрагидрофолатом.

Большое число биохимических превращений представляет собой перенос ацильных групп. Соответствующие ферменты объединены в подкласс *ацилтрансфераз* (подкласс 2.3). В большей части этих превращений принимает участие специальный кофермент (72)



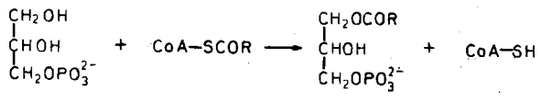
72

известный под названием *кофермента А*. Его обычно обозначают как CoA или, если требуется записать в химических символах связанный с ним ацильный остаток, его записывают в виде CoA—SH, поскольку ацильные остатки связываются с коферментом А тиоэфирной связью. В частности, кофермент А является акцептором ацильных остатков, образующихся при окислительном декарбоксилировании α-кетокислот в виде S6-ацилдигидролипоамидов по реакции (IV. 4).

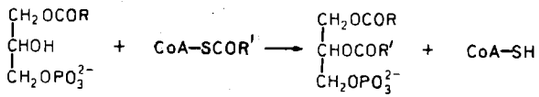


(IV.15)

С помощью ацилкофермента А осуществляется большое число реакций ацилирования. В качестве примера можно привести реакции ступенчатого ацилирования фосфата глицерина с образованием фосфатидной кислоты — промежуточного соединения в биосинтезе фосфолипидов и жиров:



(IV.16а)

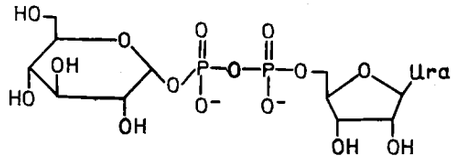


(IV.16б)

Соответствующие ферменты называют *глицерофосфат ацилтрансфераза* (КФ 2.3.1.15) и *1-ацилглицерофосфат ацилтрансфераза* (КФ 2.3.1.51).

Роль кофермента А не ограничивается переносом ацильных остатков. Многие другие превращения ацильных остатков, в том числе окислительная деструкция жирных кислот, проходят в живых организмах не со свободными кислотами, а в виде соответствующих ацильных производных кофермента А.

В отдельный подкласс выделены *гликозилтрансферазы* — ферменты, катализирующие перенос гликозильных остатков. Эти ферменты, в частности, играют основную роль в синтезе полисахаридов и в первой фазе их деструкции. Рост полимерных цепей полисахаридов происходит с участием специальных коферментов — *нуклеозиддифосфатсахаров*. Например, синтез гликогена и крахмала идет путем переноса гликозильного остатка на 4-гидроксигруппу растущей цепи от *уридиндифосфатглюкозы* (73):



73

Пользуясь сокращенной трехбуквенной символикой, введенной для нуклеотидов и сахаров (см. § 2.2. и 2.3), можно записать уридиндифосфатглюкозу в виде α-D-GlcPPUrd, а уравнение биосинтеза гликогена в виде

$$\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-...+}\ \alpha\text{-D-Glc 1PPUrd}\longrightarrow$$
$$\longrightarrow \alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-...+ PPUrd} \qquad (IV.17)$$

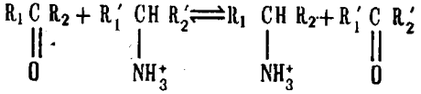
Фермент, катализирующий эту реакцию, называют *гликогенсинтазой*. На примере этого процесса видно, что синтез биополимеров может идти путем реакций переноса между растущей цепью полимера и мономером. Этот общий принцип характерен и для синтеза других важнейших биополимеров — белков и нуклеиновых кислот. Соответствующие реакции рассмотрены в следующей главе.

Деградация запасных полисахаридов также начинается с реакции переноса гликозильных остатков, в этом случае от полимерной цепи на фосфорную кислоту с образованием глюкозо-1-фосфата. Фермент, катализирующий эту реакцию

$$\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-...+}$$
$$+\ HPO_4^{2-}\longrightarrow \text{Glc-1P} + \alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}\ (1\longrightarrow 4)\text{-...} \qquad (IV.18)$$

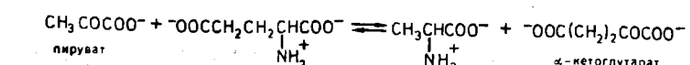
известен под названием *фосфорилаза*. Его систематическое название — 1,4-α-D-глюкан : ортофосфат α-D-глюкозилтрансфераза (КФ 2.4.1.1).

Большую группу ферментов образуют *аминотрансферазы*, или трансаминазы — ферменты, катализирующие реакции общего вида



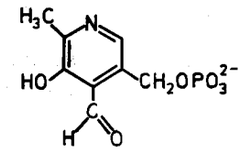
(R_2 = H или COO^-, R_2' = COO^-).

Эти ферменты образуют подкласс 2.6.1 и катализируют десятки различных превращений. Они играют важную роль в образовании и деградации аминокислот (см. § 9.4 и 9.5). В качестве примера можно привести фермент *аланинаминотрансферазу*, катализирующую процесс



(IV.19)

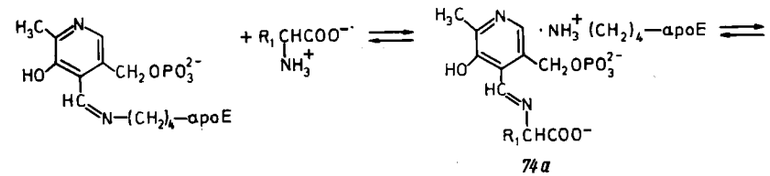
Общим для всех аминотрансфераз является участие в качестве кофактора *пиридоксальфосфата* (74):



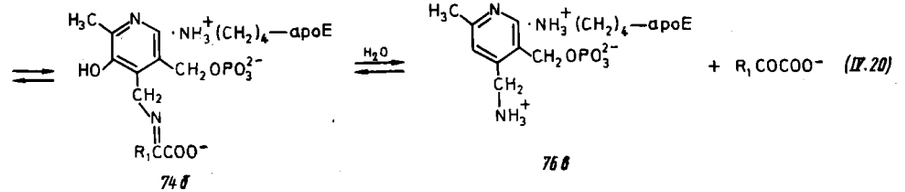
74

Пиридоксальфосфат ковалентно связан с апоферментом через альдегидную группу, которая образует шиффово основание с ε-аминогруппой одного из остатков лизина апофермента ($NH_3^+(CH_2)_4$ — apoE).

В присутствии специфичной для фермента α-аминокислоты происходит вытеснение пиридоксальфосфата с остатка лизина с образованием шиффова основания (74 а) с α-аминогруппой этой аминокислоты, за которым следует его каталитическая изомеризация в новое шиффово основание — производное пиридоксаминфосфата и α-кетокислоты (74 б). Гидролиз последнего приводит к освобождению α-кетокислоты и образованию комплекса апофермента с *пиридоксаминфосфатом* (74 в):



74 а



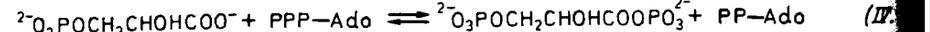
74 б *74 в*

(IV.20)

Если в системе присутствует вторая, специфичная для фермента α-кетокислота R_2COCOO^-, то она может вступать в реакцию с комплексом (74 в). Протекание всей последовательности превращений в обратном направлении приводит к образованию аминокислоты $R_2CH(NH_3^+)COO^-$, т. е. к реакции переаминирования с регенерацией пиридоксальфосфатного производного апофермента.

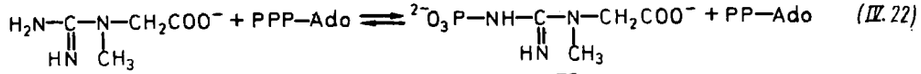
Один из самых больших подклассов трансфераз — ферменты, катализирующие перенос остатков фосфорной кислоты, ее ангидридов и эфиров (подкласс 2.7). Ряд органических веществ, в первую очередь сахара, в живых организмах подвергаются деструкции и синтезируются в виде их фосфорных эфиров. В связи с этим большое значение имеют реакции переноса остатка фосфорной кислоты к различным соединениям, причем в подавляющем большинстве случаев донором фосфата является АТФ. Такие ферменты называют *киназами*. Примером

может служить *фосфоглицераткиназа* (КФ. 2.7.2.3), пространственная структура которой приведена в § 3.3.(см. табл. 3.5; рис. 19), катализирующая реакцию.



(IV.

В мышцах позвоночных в значительных количествах присутствует *фосфокреатин* (75), который способен пополнять быстро расходуемые при интенсивной мышечной деятельности запасы АТФ, передавая остаток фосфорной кислоты на накапливающуюся АДФ. Реакция, катализируемая ферментом *креатинкиназой*, описывается уравнением (записано в обратном направлении)



(IV.22)

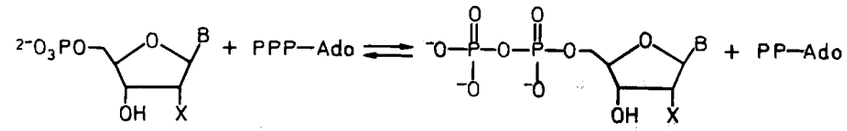
75

Поскольку при использовании АТФ в ряде случаев продуктом ее превращения является АМФ, а для регенерации АТФ необходим АДФ, то в местах интенсивного расходования АТФ, как правило, присутствует фермент *аденилаткиназа*, катализирующая этот процесс

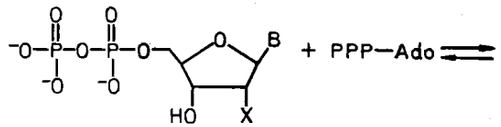


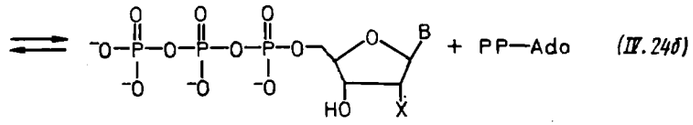
(IV.23)

в результате которого АМФ превращается в АДФ. Аналогичные процессы происходят со всеми нуклеозидмоно- и дифосфатами как рибо-, так и дезоксириборяда в связи с необходимостью превращения их в нуклеозидтрифосфаты — субстраты синтеза нуклеиновых кислот и некоторых других важных превращений. Процесс катализируется ферментами — *нуклеозидмонофосфаткиназами*, приводящими к образованию дифосфатов, и *нуклеозиддифосфаткиназами*, дающими соответствующие нуклеозидфосфаты:



(IV.24

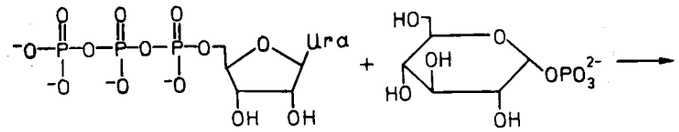


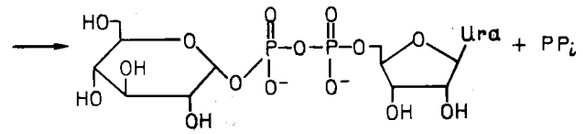


(IV.24б)

(здесь X = H, OH).

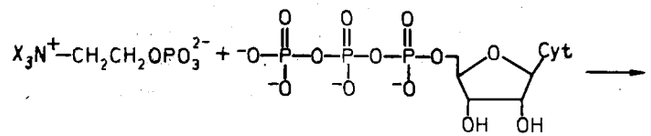
Ряд важных биохимических процессов представляет собой перенос нуклеотидных остатков. По этому механизму проходит биосинтез нуклеиновых кислот — нуклеотидные остатки переносятся от нуклеозидтрифосфата на растущую полинуклеотидную цепь с помощью соответствующих полимераз нуклеиновых кислот (подробнее см. § 5.4, 5.5 и 5.7). По механизму переноса нуклеотидного остатка образуются нуклеозиддифосфатсахара. Например, уридиндифосфатглюкоза образуется по реакции, катализируемой глюкозо-1-фосфат уридилилтрансферазой:

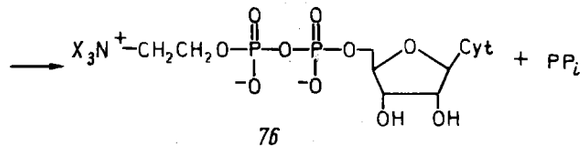




(IV. 25)

Промежуточным соединением при биосинтезе фосфолипидов — фосфатидилхолина (лецитина) и фосфатидилэтаноламина являются соответствующие производные цитидиндифосфата. Они образуются по реакциям





(IV. 26)

76

а) X = CH_3 — холин

б) X = H — этаноламин

катализируемым соответственно *холинфосфат цитидилилтрансферазой* и *этаноламинфосфат цитидилилтрансферазой*. Продукты этих реакций — *ЦДФ-холин* (76 а) и *ЦДФ-этаноламин* (76 б) далее выступают в качестве доноров остатков холинфосфата и этаноламинфосфата в реакции с диацилглицерином, переводя последний в соответствующие фосфолипиды.

4.3 ГИДРОЛАЗЫ

Ферменты третьего класса — *гидролазы* — катализируют различные реакции гидролиза. Подклассы подразделяют в соответствии с типом гидролизуемых связей. Ферменты, катализирующие гидролиз эфиров карбоновых кислот, образуют первый подкласс (3.1), гидролиз гликозидных связей — подкласс 3.2, гидролиз простых эфиров и тиоэфиров — подкласс 3.3, гидролиз пептидных связей

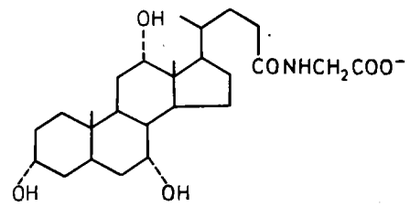
— подкласс 3.4, гидролиз связей C—N, отличных от пептидных связей, — подкл 3.5, гидролиз ангидридных связей — подкласс 3.6 и т. д.

Рекомендованные названия многих гидролаз образуют из названия гидро зуемых субстратов с добавлением окончания *-аза*. Примером может служить у минавшаяся в § 2.1 ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхол на до ацетата и холина. Систематическое название содержит наименование гидролизуемого субстрата и название отщепляемой группы в сочетании со словом *гидролаза*. Так, систематическое название ацетилхолинэстеразы — ацетилхолин ацетилгидролаза. Следует, однако, отметить, что вследствие достаточно сложного и зачастую до конца не выявленного характера специфичности многих гидролаз не всегда удается дать им систематическое название. В этих случаях рекомендованы эмпирические названия, присвоенные им при первом описании. Так, не имеют систематического названия такие ферменты, как трипсин или химотрипсин, рассмотренные в § 6.1.

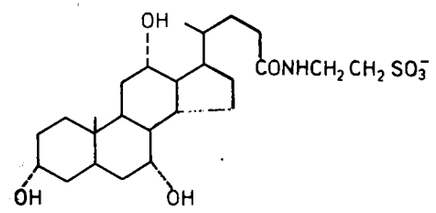
С помощью окончания *-аза* образуются названия и отдельных групп родственных ферментов. Так, ферменты, катализирующие гидролиз внутренних связей в полипептидах и белках, называют *протеазами*, катализирующие гидролитическое отщепление N-концевой аминокислоты — *аминопептидазами*, отщепление C-концевой аминокислоты — *карбоксипептидазами*, катализирующие гидролиз нуклеиновых кислот — *нуклеазами* и т. п. В последнем случае принято различать *эндонуклеазы* — ферменты, катализирующие гидролиз внутренних фосфодиэфирных групп, и *экзонуклеазы*, с помощью которых происходит гидролитическое отщепление какого-либо из концевых нуклеотидов. Некоторые из нуклеаз обладают высокой специфичностью к одному из классов нуклеиновых кислот — ДНК или РНК. В этом случае их называют соответственно дезоксирибонуклеазами (ДНКазами) или рибонуклеазами (РНКазами).

Функцией большого числа гидролаз является гидролиз биополимеров — бе ков, нуклеиновых кислот, полисахаридов. Все эти гидролитические процес термодинамически выгодны, т. е. характеризуются отрицательным значени величины ΔG. Значительная часть гидролаз представлена пищеварительными ферментами, с помощью которых полимеры, поступающие с пищей в организмы многоклеточных животных, расщепляются до мономеров и реутилизируются для построения новых биополимеров по собственным наследственным программам. У высших животных пищеварительные гидролазы выделяются рядом органов, участвующих в пищеварении, — слюнными железами, желудком, поджелудочной железой, стенками кишечника. В слюне содержится *α-амилаза*, катализирующая расщепление на ди- и олигосахаридные блоки крахмала и гликогена. В желудочном соке содержится *пепсин* — протеаза, расщепляющая белки на большие фрагменты, преимущественно по остаткам фенилаланина и лейцина. Отличительной особенностью этого фермента является способность функционировать в кислой среде, характерной для желудочного сока (pH 1-3). Поджелудочная железа продуцирует широкий спектр пищеварительных ферментов, многие из которых уже упоминались в тексте,— это рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, трипсин, химотрипсин, эластаза. Выделяются также α-амилаза, завершающая гидролиз полимерных сахаров, *липазы и фосфолипазы*, катализирующие гидролиз сложноэфирных связей в жирах и фосфолипидах с освобождением жирных кислот. В последнем процессе важную роль играют *желчные кислоты*, поставляемые в кишечный тракт печенью через желчный проток — гликохолевая (77) и таурохолевая (78),

которые, будучи эффективными детергентами, эмульгируют жиры и облегчают действие на них липаз. Окончательная деградация до мономеров проходит под действием ферментов, выделяемых стенками двенадцатиперстной и тонкой кишок. В их числе *сахараза* (β-фруктофуранозидаза) и *мальтаза* (α-D-глюкозидаза), расщепляющие дисахариды сахарозу и мальтозу до мономеров, *фосфомоноэстераза* (кислая фосфатаза), превращающая нуклеотиды в нуклеозиды, пептидазы, завершающие превращение белков в аминокислоты.



77



78

Переваривание биополимеров происходит не только в желудочно-кишечном тракте, но и внутри эукариотических клеток в специальных органеллах, отделенных от остальных отделов цитоплазмы специальной мембраной, — *лизосомах*. Для этих органелл характерно наличие ферментов, имеющих оптимум pH в слабокислой среде. Таким образом, собственные биополимеры клетки как бы дважды застрахованы от разрушения гидролазами лизосом — наличием мембраны, непроницаемой для гидролаз, и неспособностью лизосомных гидролаз функционировать при нейтральном pH, характерном для цитоплазмы.

Следует отметить, что гидролазы, катализирующие гидролиз биополимеров, имеют огромное значение не только для отдельных живых организмов, но и для биосферы в целом. Если бы эти процессы не осуществлялись в большом масштабе, то за исторически короткий срок исчерпались бы все ресурсы биогенных элементов и они оказались бы омертвленными в виде биополимеров погибших организмов.

Гидролиз полимеров, помимо его значения для реутилизации важнейших мономеров, играет в живой природе еще по крайней мере две важные роли. Во-первых, это уничтожение внутри клетки биополимеров, которые, выполнив свою функцию, становятся ненужными на последующем этапе жизнедеятельности. Известно, например, что у прокариот время жизни отдельных молекул мРНК, как правило, невелико — выполнив свою функцию в производстве необходимых клетке белков, они гидролизуются до мономеров и повторно используются для создания новых молекул мРНК, необходимых для следующего этапа жизни клеток. Во-вторых, это осуществление так называемого *процессинга* белков и рибонуклеиновых кислот. Многие белки и РНК синтезируются не в зрелом виде, а в виде предшественников, содержащих дополнительные фрагменты полинуклеотидных или полипептидных цепей. Эти фрагменты удаляются с помощью специальных гидролаз, и такая обработка предшественников с образованием зрелых молекул называется процессингом.

Например, многие белки, которые должны выводиться за пределы производящей их клетки,— иммуноглобулины, гормоны и др.— снабжены специальными *сигнальными последовательностями* аминокислот на N-конце первичной полипеп-

тидной цепи в виде 15—20 остатков с резким преобладанием гидрофобных аминокислот. Такие белки называют пробелками. После прохождения синтезированной полипептидной цепи через мембрану сигнальные последовательности отщепляются с помощью специальных связанных с мембранами протеаз. Кроме того, многие белки синтезируются в виде функционально неактивных предшественников — пробелков. Это может иметь двоякое значение. Во-первых, это позволяет включить их функцию не сразу, а по достижении ими определенной мишени. Например, трипсин, который синтезируется поджелудочной железой в виде неактивного *трипсиногена*, активируется в кишечнике при действии специальной кишечной протеазы — *энтеропептидазы*, которая катализирует отщепление с N-конца гексапептида. Во-вторых, это существенно для сворачивания белка в глобулу с определенной пространственной структурой. Например, инсулин синтезируется в виде *препроинсулина*, который после отщепления сигнальной последовательности дает предшественник проинсулин (см. рис. 31). Проинсулин способен самопроизвольно принять пространственную структуру, обеспечивающую взаимное сближение нужных пар остатков цистеина и образование необходимых дисульфидных мостиков. После этого из него вырезается значительный фрагмент — С-пептид, в результате чего образуется инсулин, состоящий из двух цепей, соединенных дисульфидными мостиками (см. рис. 3).

Важное физиологическое значение имеют системы протеаз (каскады), обеспечивающие такие процессы, как свертывание крови, регуляция кровяного давления, расщепление чужеродных антигенов после их связывания с антителом (система комплемента). В качестве примера можно привести систему ренин — ангиотензин. Собственно *ангиотензин*, или ангиотензин II, — октапептид, обладающий способностью повышать кровяное давление, имеет строение

Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe

Он синтезируется в печени в виде 14-звенного предшественника — ангиотензиногена:

Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe—His—Leu—Leu—Val—Tyr—Ser

Под действием фермента *ренина* предшественник гидролизуется по связи Leu—Leu, что приводит к образованию малоактивного декапептида — ангиотензина I. Затем при действии специального фермента — *дипептидилкарбоксипептидазы* — происходит отщепление С-концевого дипептида, что приводит к образованию ангиотензина II. И наконец, чтобы выключить действие ангиотензина, в крови существует специальная гидролаза — *пролинкарбоксипептидаза*, которая специфично катализирует гидролитическое отщепление С-концевой аминокислоты, если она расположена после остатка пролина. С помощью этого фермента происходит отщепление от ангиотензина II С-концевого фенилаланина, что приводит к инактивации (в связи с направленностью его биологического действия на ангиотензин этот фермент называют также ангиотензиназой).

Наряду с изложенным выше гидролазы выполняют широкий спектр других биологических функций. Некоторые примеры уже приводились — это ацетилхолинэстераза, гидролизующая избыточный ацетилхолин после передачи с его помощью возбуждения в синапсе, и зависимая от ионов натрия и калия аденозинтрифосфатаза, катализирующая гидролиз АТФ, сопряженный с переносом ионов калия и натрия через мембрану. Многие примеры будут приведены в ходе дальнейшего изложения курса.

4.4. ЛИАЗЫ

Ферменты четвертого класса, *лиазы*, катализируют в одном направлении негидролитическое расщепление субстрата с образованием кратной связи или, реже, цикла, а в другом направлении — присоединение по кратной связи. Примером фермента этого класса может служить упоминавшаяся в § 1.1 карбоангидраза, катализирующая реакцию

$$HO{-}COO^- + H^+ \rightleftharpoons CO_2 + H_2O \qquad (IV.27)$$

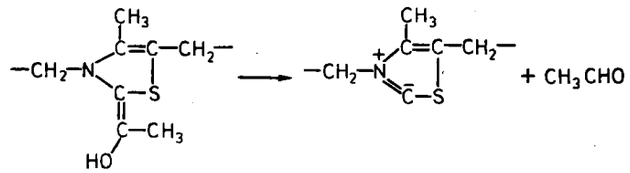
При разрыве связи С—О возникает вторая кратная связь и образуется молекула CO_2.

Лиазы классифицируются по типу разрываемой связи. Подкласс 4.1 образуют С—С-лиазы, подкласс 4.2 — С—О-лиазы, подкласс 4.3 — С—N-лиазы и т. д. Систематическое название фермента складывается из названия расщепляемого субстрата, названия отщепляемого фрагмента и слова «лиаза». Например, карбоангидразу рассматривают как фермент, способствующий отщеплению воды, и систематическое название фермента — карбонат гидролиаза.

Большой подподкласс С—С-лиаз составляют ферменты, катализирующие отщепление CO_2 от карбоновых кислот. Например, при спиртовом брожении пируват, образующийся при окислительной деструкции глюкозы, декарбоксилируется по реакции

$$CH_3COCOO^- \xrightarrow{+H^+} CH_3CHO + CO_2 \qquad (IV.28)$$

Эта реакция предшествует заключительной стадии спиртового брожения — восстановлению ацетальдегида до этанола (см. § 6.1). Ферменты рассматриваемого подподкласса обычно называют *декарбоксилазами*. Превращение (IV.28) катализируется в соответствии с этим *пируват декарбоксилазой*. Попутно следует отметить, что этот фермент содержит в качестве кофактора тиаминпирофосфат и, следовательно, на первом этапе пируват декарбоксилаза функционирует аналогично пируват дегидрогеназе. Однако на последней стадии происходит гидролиз «активного альдегида» (67 а) с освобождением ацетальдегида и регенерацией активной формы тиаминпирофосфата:



(IV.29)

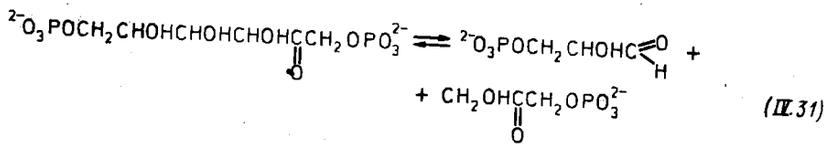
Существует довольно большая группа ферментов, катализирующих декарбоксилирование α-аминокислот с образованием соответствующих аминов:

$$\underset{\underset{NH_3^+}{|}}{RCHCOO^-} \xrightarrow{+H^+} RCH_2NH_3^+ + CO_2 \qquad (IV.30)$$

По этому пути образуются многие важные физиологически активные соединения. Например, при декарбоксилировании L-глутаминовой кислоты под действием *глутамат декарбоксилазы* образуется *γ-аминомасляная кислота* — важный нейромедиатор, функционирующий в первую очередь в мозге. γ-Аминобутират действует на специальные рецепторы, находящиеся на мембране нейрона, воспринимающего сигнал через синапс (постсинаптическая мембрана), причем результатом взаимодействия с этими рецепторами является увеличение проницаемости постсинаптической мембраны для ионов калия. Поскольку нормальная передача возбуждения через синапс приводит к открытию каналов для ионов натрия, в результате которого и возникает потенциал действия (см. § 2.1), то γ-аминобутират, организующий встречный поток ионов калия через постсинаптическую мембрану, противодействует передаче сигнала, т. е. является нейромедиатором, тормозящим передачу нервного возбуждения. Другой фермент этой же группы — *декарбоксилаза ароматических аминокислот* — участвует в декарбоксилировании 3,4-диоксифенилананина, продукта гидроксилирования тирозина, что приводит к образованию 3,4-диоксифенилэтиламина, промежуточного соединения в системе гормона адреналина (см. § 2.5).

Декарбоксилазы аминокислот в большинстве своем являются пиридоксалевыми ферментами. Выделение CO_2 происходит через такое же промежуточное образование основания Шиффа между пиридоксальфосфатом и аминокислотой, как в случае реакций переаминирования (см. § 4.2). Направление химического превращения — отщепление CO_2 либо изомеризация с образованием основания Шиффа — производного пиридоксамина и α-кетокислоты — определяется природой белка, т. е. апофермента. На этом примере можно еще раз убедиться в том, что белковый компонент комплекса организует и направляет работу кофермента. Здесь уместно добавить, что и серингидроксиметилтрансфераза, рассмотренная в § 4.2, также является пиридоксалевым ферментом, но структура апофермента предопределяет течение процесса в направлении разрыва связи $C_\alpha—C_\beta$.

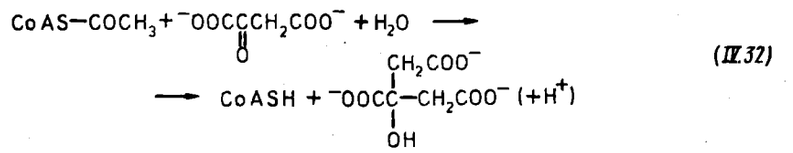
Подподкласс 4.1.2 — альдегидлиазы — ферменты, катализирующие разрыв С—С-связи, сопровождающийся возникновением альдегидной группы. Например, в цепи ферментативных реакций, ведущих к превращению глюкозы в трехуглеродные фрагменты, разрыв шестиуглеродной цепи происходит на стадии превращения фруктозо-1,6-дифосфата в 3-фосфоглицериновый альдегид и дигидроксиацетонфосфат по реакции



(IV.31)

Этот процесс катализируется ферментом, известным под названием *альдолазы* или *фруктозодифосфат альдолазы*, которая, как видно из приведенного химического уравнения процесса, является альдегидлиазой. Рекомендованное название фермента связано с тем, что в обратном направлении он катализирует альдольную конденсацию. Превращение (IV.31) обратимо и является важным звеном как при деструкции, так и при синтезе моносахаридов.

В качестве еще одного важного примера С—С-лиаз приведем фермент *цитрат синтазу*, катализирующую присоединение ацетильного фрагмента ацетилкофермента А по карбонильной группе оксалацетата с образованием лимонной кислоты. Процесс сопровождается гидролизом тиоэфирной группы, связывающей карбоксиметильный фрагмент, произошедший из ацетильной группы, с коферментом А:

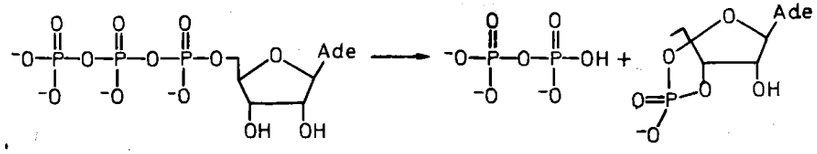


(IV.32)

Гидролиазы, относящиеся к подклассу 4.2, чаще всего катализируют присоединение воды по двойной связи или реакции дегидратации гидроксисоединений с образованием двойной связи. Например, таким образом происходит превращение фумарата в малат (соль яблочной кислоты), катализируемое *фумаратгидратазой* (по систематической номенклатуре малатгидролиаза):

$$^-OOCCH{=}CHOO^- + H_2O \rightleftharpoons {}^-OOCCH(OH)CH_2COO^- \qquad (IV.33)$$

В качестве примера реакции, катализируемой лиазой, приводящей к образованию цикла, можно привести *аденилат циклазу* — фермент, катализирующий превращение АТФ в циклический *аденозин-3′,5′-циклофосфат* (77) (АТФ-пирофосфатлиаза циклизующая) — соединение, участвующее в регуляции большого числа биохимических процессов (см. § 10.2):



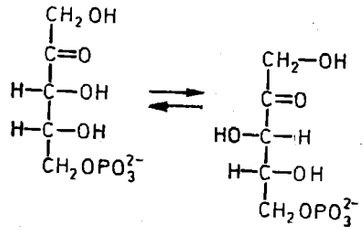
(IV.34)

4.5. ИЗОМЕРАЗЫ

Изомеразы — ферменты, катализирующие различные процессы изомеризации. Первый подкласс составляют различные ферменты, с помощью которых осуществляется обращение конфигурации при хиральном атоме С. Если такой центр в молекуле субстрата один, то происходит обращение конфигурации молекулы в целом. Поскольку оптические изомеры термодинамически эквивалентны (по крайней мере, в отсутствие других хиральных молекул, способных давать комплекс предпочтительно с одним из энантиомеров), то фермент в равной мере катализирует обращение конфигурации в обоих направлениях и конечным итогом действия такого фермента является образование рацемической смеси. Поэтому такие ферменты называют *рацемазами*.

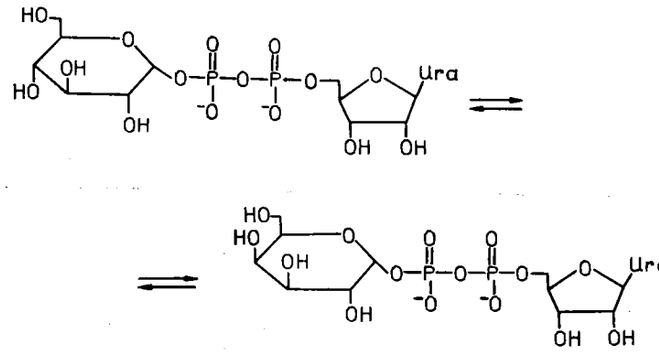
Если в молекуле имеется несколько хиральных атомов С, то обращение конфигурации при одном из них приводит к образованию нового диастереомера. Ферменты, катализирующие такие процессы, называют *эпимеразами*. Они играют

важную роль во взаимопревращениях сахаров. В качестве примера можно привести D-*рибулозо-5-фосфат-3-эпимеразу*, катализирующую взаимопревращение рибулозо-5-фосфата и ксилулозо-5-фосфата:



(IV.35)

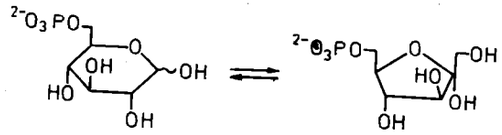
Некоторые из таких превращений происходят на уровне соответствующих нуклеозиддифосфатсахаров. Так, в образовании и деструкции галактозы — компонента молочного сахара лактозы — ключевым превращением является процесс, катализируемый *УДФ-глюкозо-4-эпимеразой*:



(IV.36)

Отдельный подкласс образуют ферменты, катализирующие *цис-транс*-изомеризацию (подкласс 5.2).

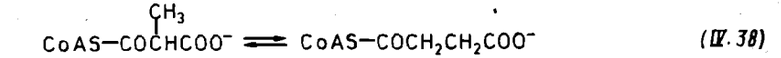
К подклассу 5.3 относятся ферменты, катализирующие внутримолекулярные процессы окисления — восстановления, в частности, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз. Примером может служить *глюкозо-6-фосфат изомераза*, катализирующая взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата:



(IV.37)

Это превращение является одним из этапов на пути окислительной и анаэробной деструкции глюкозы, гликогена и крахмала, непосредственно следующее за образованием глюкозо-6-фосфата.

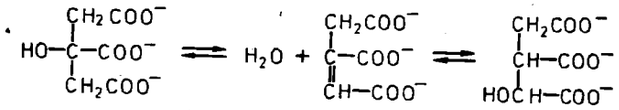
Подкласс 5.4 образуют ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос различных фрагментов. Например, при деструкции кислот с разветвленным углеродным скелетом на одной из заключительных стадий происходит изомеризация метилмалоновой кислоты в янтарную. При этом изомеризации подвергаются не сама кислота, а соответствующее производное кофермента А:



(IV.38)

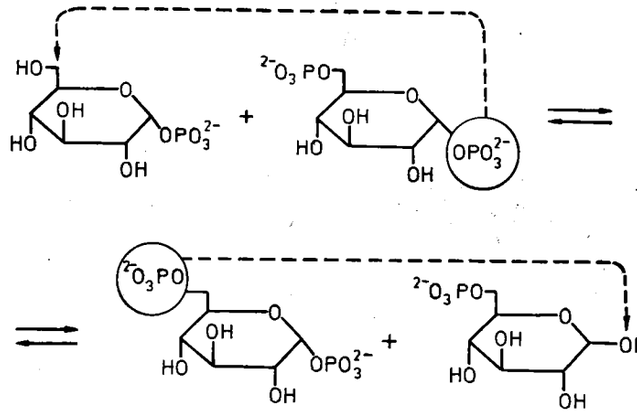
Процесс катализируется S-*метилмалонил-CoA мутазой*. Этот фермент, как и некоторые другие ферменты, катализирующие изомеризацию углеродного скелета, использует в качестве кофактора кобаламин (кобамидный кофермент, см.§2.6).

Следует отметить, что не все биохимические процессы, итогом которых является изомеризация, катализируются изомеразами. Так, изомеризация лимонной кислоты в изолимонную происходит при участии лиазы, катализирующей реакции гидратации аконитовой кислоты и дегидратации лимонной и изолимонной кислот, — *аконитаза* или цитрат (изоцитрат) гидролиаза:



(IV.39)

Взаимопревращения изомерных глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата происходят с участием фермента, катализирующего перенос остатка фосфорной кислоты с 1- или -6-гидроксигруппы глюкозо-1,6-дифосфата соответственно на 6-ОН-группу глюкозо-1-фосфата или на 1-ОН-группу глюкозо-6-фосфата:



(IV.40)

Фермент, строго говоря, работает как трансфераза, однако его классифицируют как изомеразу и он имеет рекомендованное название *фосфоглюкомутаза*.

4.6. ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ)

Шестой класс составляют ферменты, катализирующие реакции конденсации или присоединения, сопряженные с гидролизом одной из пирофосфатных связей в молекуле АТФ или ГТФ. Эти ферменты получили общее название *синтетаз* или *лигаз*.

В качестве примера может служить группа ферментов, называемых *аминоацил-*

тРНК-синтетазами. Эти ферменты катализируют реакцию конденсации аминокислоты, приводящую к присоединению ее в виде аминоацильного остатка по какой-либо из гидроксигрупп 3′-концевого аденозина одной или нескольких транспортных РНК (тРНК), специфичных к этой аминокислоте. Следует сразу же подчеркнуть, что специфичность тРНК к определенной аминокислоте не связана с каким-либо повышенным сродством к этой аминокислоте, а обусловлена исключительно свойствами фермента, катализирующего эту реакцию. Каждая аминоацил-тРНК-синтетаза обладает сродством, с одной стороны, к определенной аминокислоте, а с другой стороны — к одной или нескольким определенным тРНК. Записывая тРНК в виде $tRNA^i - OH$, где OH — реагирующая гидроксигруппа, а индекс i соотносит тРНК к i-й α-аминокислоте $NH_3^+CHR_iCOO^-$, можно стехиометрическое уравнение реакции, катализируемой аминоацил-тРНК-синтетазой, записать в виде

$$tRNA^{(i)}\text{—OH} + NH_3^+CHR_iCOO^- + PPP\text{—Ado} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons tRNA^{(i)}\text{—OCOCHR}_iNH_3^+ + P\text{—Ado} + PP_i \qquad (IV.41)$$

В результате таких реакций, происходящих с каждой из 20 аминокислот, входящих в состав белков, аминокислоты оказываются рассортированными по соответствующим тРНК. Это имеет кардинальное значение для последующего отбора аминокислот при биосинтезе белка на рибосомах, поскольку кодоны, расположенные вдоль информационной РНК и программирующие последовательность присоединения аминокислот к растущей полипептидной цепи, опознают не аминокислотные остатки, а связанные с ними тРНК. Подробнее этот вопрос рассматривается в § 5.6.

Систематическое название ферментов шестого класса образуется либо из названия продукта реакции в сочетании со словом *синтетаза*, либо из названий соединяемых субстратов в сочетании со словом *лигаза*. В скобках указывается продукт, который образуется в результате сопряженного гидролиза АТФ или ГТФ. Например, аминоацил-тРНК-синтетаза, катализирующая реакцию (IV.41), для случая R_i = H (т. е. когда речь идет о глицине) называется глицил-тРНК синтетаза или глицин: тРНК лигаза (образующая АМФ).

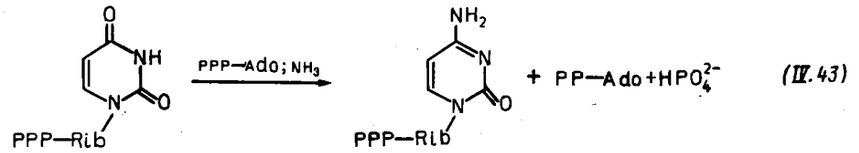
Разделение на подклассы связано с типом образуемой связи. К подклассу 6.1 относят ферменты, катализирующие образование связей C—O (в том числе аминоацил-тРНК синтетазы), к подклассу 6.2 — образование связей C—S, к подклассу 6.3 — связей C—N, к подклассу 6.4 — связей C—C и к подклассу 6.5 — связей P—O.

Подкласс 6.2 представлен в первую очередь ферментами, катализирующими образование тиоэфиров карбоновых кислот с коферментом А. Так, окислительная деструкция жирных кислот, образующихся из жиров и других липидов, начинается с превращения их в ацилкофермент А по реакции

$$RCOO^- + CoA - SH + PPP - Ado \rightleftharpoons CoA - SCOR + P - Ado(АМФ) + PP_i \quad (IV.42)$$

катализируемой *ацилкофермент А синтетазой* (образующей АМФ).

Ферменты подкласса 6.3 катализируют многочисленные реакции введения азотсодержащих групп в органические соединения. Примером может служить фермент УТФ: *аммиак лигаза*, катализирующая превращение урацила в цитозин в составе уридин-5′-трифосфата — главный путь образования цитидиловых нуклеотидов (см. § 9.6):

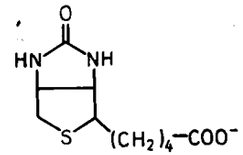


(IV.43)

Ферменты подкласса 6.4 катализируют в основном присоединение CO_2 к углеродному скелету. К их числу, в частности, относятся *пируваткарбоксилаза*, при участии которой происходит превращение пирувата в оксалоацетат:

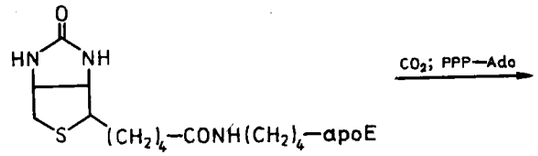
$$CO_2 + CH_3COCOO^- + PPP - Ado \rightleftharpoons {}^-OOCCH_2COCOO^- + PP - Ado + HPO_4^{2-} \quad (IV.44)$$

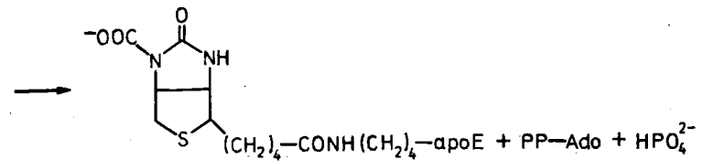
Ферменты, катализирующие реакции карбоксилирования, содержат в качестве кофактора *биотин* (80), который связан своей карбоксильной группой с ε-аминогруппой остатка лизина апофермента:



80

Биотин является промежуточным переносчиком CO_2, присоединяя его по имидному атому азота:





Примером фермента подкласса 6.5. может служить *РНК-лигаза*, образующаяся в клетках *E. coli*, инфицированных бактериофагом T4, ДНК которого содержит генетическую программу для синтеза этого фермента. Этот фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между рибоолигонуклеотидом-донором, имеющим на 5′-конце остаток фосфорной кислоты, и рибоолигонуклеотидом-акцептором, имеющим на 3′-конце свободную 3′-гидроксигруппу. В

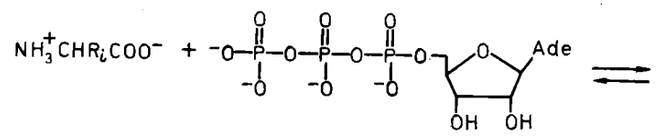
сокращенной символике, обозначая произвольный остаток нуклеозида как X, можно записать общее уравнение реакции, катализируемой РНК-лигазой, в виде

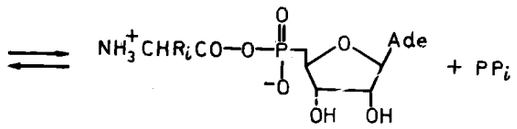
$$pX_1...pX_mOH + pX_{m+1}...pX_n + PPP - Ado \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons pX_1...pX_mpX_{m+1}...pX_n + P - Ado + PP_i \qquad (IV.45)$$

Фермент довольно широко применяется для синтеза олигорибонуклеотидов.

Все лигазы катализируют реакции, идущие с участием трех субстратов и дающие три продукта. Во всех изученных случаях процесс идет через две или три стадии, причем первые не требуют участия всех трех субстратов и поэтому могут изучаться и осуществляться в упрощенной системе. Во всех случаях синтез продукта и гидролиз АТФ проходят сопряженно через некоторый общий промежуточный продукт.

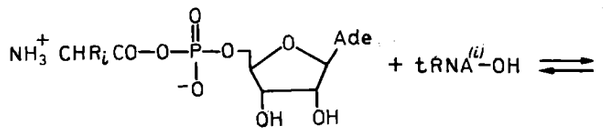
Так, аминоацилирование тРНК начинается с реакции образования смешанного ангидрида аминокислоты и адениловой кислоты — *аминоациладенилата*:

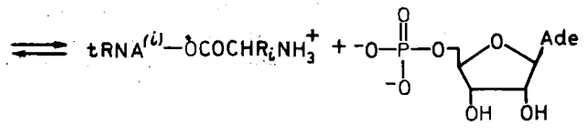




Последний образуется в виде очень прочного комплекса с ферментом и в растворе не накапливается, оставаясь в стехиометрическом количестве по отношению к ферменту. Его образование может быть легко зарегистрировано, если добавить в систему [^{32}P] пирофосфат. В результате обратимого характера процесса в системе начнется накопление меченого [^{32}P] АТФ, т. е. обмен ^{32}P между АТФ и пирофосфатом, причем этот обмен наблюдается только в присутствии соответствующей ферменту аминокислоты.

Если в системе находится специфичная к ферменту, а тем самым к аминокислоте, транспортная РНК, происходит вторая стадия — перенос аминоацильного остатка с аминоациладенилата на тРНК:





РНК-лигаза катализирует трехстадийный процесс. На первой стадии АТФ реагирует с ферментом, фосфорилируя гидроксигруппу остатка серина в активном центре:

$$E-CH_2OH + PPP-Ado \rightleftharpoons E-CH_2O-P-Ado + PP_i$$

На этой стадии не участвуют ни донор, ни акцептор. На второй стадии происходит взаимодействие аденилового производного фермента с донором с образованием смешанного ангидрида донора и АМФ:

$$E-CH_2O-P-Ado + pX_{m+1}...pX_n \longrightarrow$$
$$\longrightarrow E-CH_2OH + \underset{\displaystyle pA}{pX_{m+1}...pX_n} \qquad (81)$$

Наконец, на третьей стадии происходит взаимодействие промежуточного пирофосфата с акцептором:

$$pX_1...pX_m-OH + \underset{\displaystyle pA}{pX_{m+1}...pX_n} \longrightarrow pX_1...pX_mpX_{m+1}...pX_n + P-Ado$$

Как и в случае аминоацил-тРНК-синтетаз, в отсутствие остальных субстратов фермент осуществляет только один цикл каталитического превращения в аденилированный фермент. Лишь после добавления донора процесс входит в каталитический режим — начинается каталитическое накопление производного (81).

4.7. КОФАКТОРЫ, КОФЕРМЕНТЫ И ВИТАМИНЫ

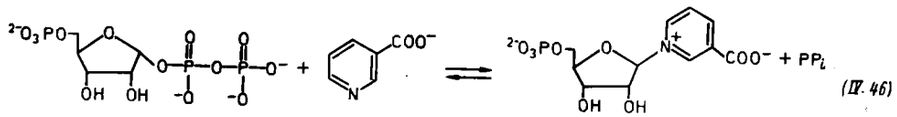
В предшествующих параграфах этой главы фигурировало значительное число сложных органических соединений — коферментов и кофакторов ферментов. Биосинтез каждого из них из простых исходных веществ проходит через значительное число стадий и требует наличия соответствующей системы специальных ферментов.

Растения и большая часть микроорганизмов, получающих из окружающей среды ограниченный набор исходных соединений, должны располагать этими системами. Для животных, в особенности высших, которые получают большой набор веществ, необходимых в качестве строительных элементов и энергетических ресурсов, в виде растительной или животной пищи, наличие многих из систем биосинтеза кофакторов и коферментов является ненужным излишеством. Либо сами кофакторы и коферменты, либо их близкие предшественники могут быть получены вместе с продуктами питания. Это означает, что вместе с основными компонентами — белками, жирами, углеродами — в продуктах питания животного должны присутствовать в очень небольших количествах, измеряемых миллиграммами или даже долями миллиграммов, все те коферменты и кофакторы, пути синтеза которых у данного вида животных отсутствуют, или вещества, легко их образующие. Речь идет именно о крайне малых количествах, поскольку, поступив в организм, эти соединения работают циклически и пополнение их запаса нужно

Вещества, являющиеся обязательными компонентами пищи высших животных и человека, но необходимые в очень малых количествах, называют *витаминами*. Следует подчеркнуть, что витамин — это не химическое и не биохимическое понятие, оно имеет чисто физиологический смысл.

Необходимость во многих витаминах обусловлена их участием в формировании циклически работающих сложных органических молекул, в первую очередь кофакторов и коферментов. Ниже приведены краткие сведения о витаминах, необходимых для обеспечения работы основных групп ферментов, рассмотренных ранее.

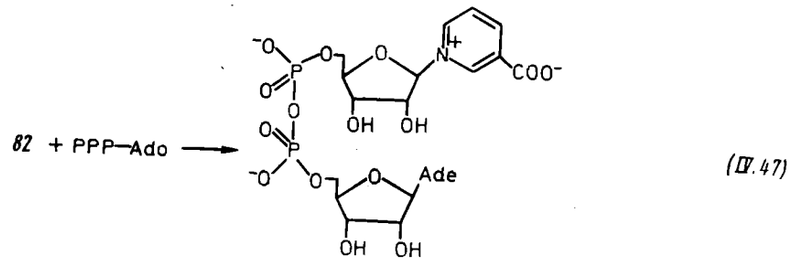
Важнейшими коферментами, участвующими в большом числе окислительно-восстановительных реакций, являются никотинамидные коферменты. Они могут образовываться исходя из триптофана (см.§ 9.5), однако сам триптофан является редкой аминокислотой и при его недостатке необходимо поступление в организм никотиновой кислоты в качестве витамина (витамин PP или B_5). Суточная потребность в ней составляет 10 —20 мг. Первая стадия ее утилизации — взаимодействие с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом — предшественником всех нуклеотидов:



(IV.46)

82

Процесс катализируется *никотинат фосфорибозилтрансферазой* с образованием 5-фосфорибозил-1-никотината (82). Затем следует реакция с АТФ, катализируемая *никотинатмононуклеотидаденилил трансферазой*



(IV.47)

83

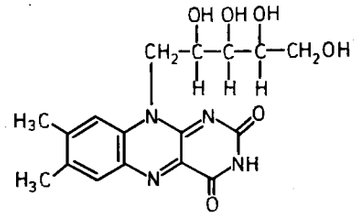
и приводящая к образованию соединения (83), называемого *деамидо-НАД*. Третья стадия, в которой в качестве донора NH_2-группы может использоваться либо NH_4^+, либо γ-амидная группа глутамина, приводит к никотинамидаденинди-нуклеотиду. Ферменты, катализирующие это превращение, называют *НАД-синтетазами*:

$$83 + PPP - Ado + NH_4^+ \longrightarrow NAD^+ + P - Ado(АМФ) + PP_i \qquad (IV.48)$$

$$83 + PPP - Ado + Gln \longrightarrow NAD^+ + P - Ado(АМФ) + PP_i + Glu \qquad (IV.49)$$

Протопорфирин — органический компонент важного кофактора оксидоредуктаз, гема — необходим животным в значительных количествах, в первую очередь для получения гемоглобина, поэтому у всех животных, включая человека, функционирует система биосинтеза протопорфирина из недефицитных предшественников (см. рис. 111, § 9.5).

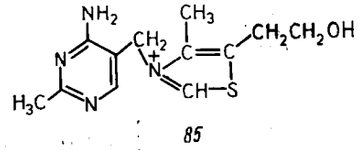
Флавиновые нуклеотиды — кофакторы целого ряда оксидоредуктаз — могут легко образоваться из *рибофлавина* (84):



84

Фосфорилирование 5-гидроксигруппы с помощью фермента *рибофлавин киназы* приводит к флавинмононуклеотиду, реакция последнего с АТФ, катализируемая ферментом *ФМН-аденилилтрансферазой* и совершенно аналогичная реакции (IV.47), приводит к флавинадениндинуклеотиду. Рибофлавин должен содержаться в продуктах питания и известен как *витамин* B_2. Суточная потребность человека в рибофлавине 1 — 3 мг.

Кофактор окислительного декарбоксилирования α-кетокислот тиаминпирофосфат легко образуется у животных и человека из *тиамина* (85)



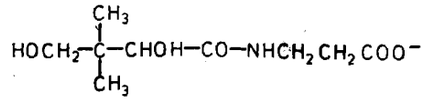
85

который является витамином (*витамин* B_1) и для человека необходим в количестве 1 — 3 мг в сутки.

Тиамин превращается в тиаминпирофосфат с помощью фермента *тиаминпирофосфат киназы*, катализирующей перенос пирофосфатного фрагмента АТФ на OH-группу тиамина.

Для завершающей стадии окислительного декарбоксилирования α-кетокислот необходима *липоевая кислота*, которую иногда называют *витамином N*.

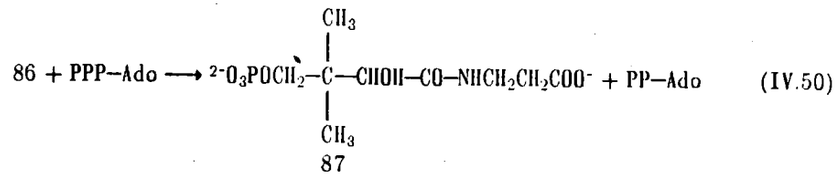
Синтез кофермента А в сравнительно небольшое число стадий может осуществляться у животных и человека исходя из *пантотеновой кислоты* (86) — витамина B_3:



86

Так как ее поставляют находящиеся в кишечнике бактерии (*E.coli*), то острая

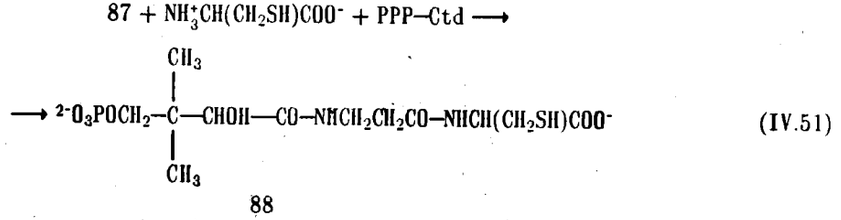
Суточная потребность человека в пантотеновой кислоте 5 — 10 мг. Кофермент А образуется из нее в следующей цепочке превращений:



(IV.50)

87

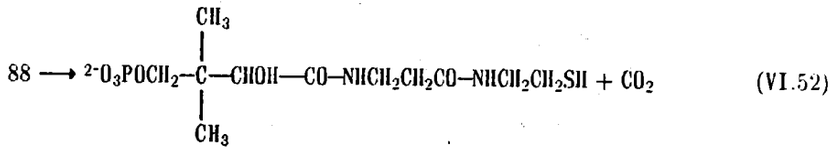
(катализируется ферментом *пантотенат киназой*),



(IV.51)

88

(катализируется ферментом *фосфопантотеноилцистеин синтетазой*),



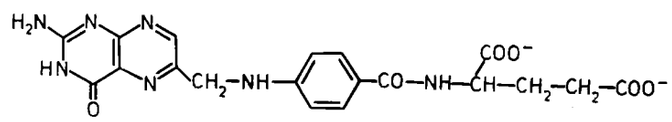
(VI.52)

89

(катализируется *фосфопантотеноилцистеин декарбоксилазой*).

Далее реакция с АТФ, аналогичная реакции (IV.47), катализируемая *пантотеинфосфат аденилилтрансферазой*, приводит к переносу остатка аденилата на 4′-фосфат (89) с образованием дефосфокофермента А, который после фосфорилирования *дефосфокофермент А киназой* по 3′-гидроксигруппе аденилового фрагмента дает кофермент А.

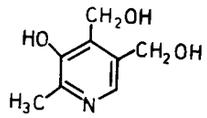
Вторым важным коферментом класса трансфераз является тетрагидрофолат — переносчик одноуглеродных фрагментов (см. § 4.2). Он поступает в организм животных в виде *фолиевой кислоты* (90):



90

которая также является одним из витаминов и необходима человеку в количестве 0,05 — 0,4 мг в сутки.

Большая группа аминотрансфераз и декарбоксилаз аминокислот содержит в качестве кофактора пиридоксальфосфат. В организм животных для его образования должен поступать пиридоксаль, пиридоксамин или пиридоксин (91) — *витамин* B_6:

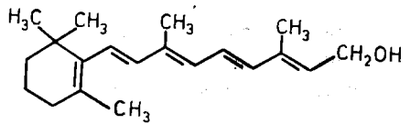


91

Пиридоксин превращается в пиридоксальфосфат путем окисления $NADP^+$ катализируемого *пиридоксин 4-дегидрогеназой*, и фосфорилирования с участием *пиридоксалькиназы*.

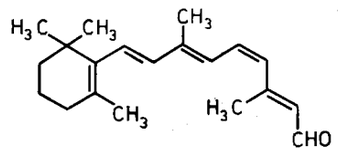
Кофактор карбоксилаз биотин сам является витамином (*витамин Н*). Его суточная доза для человека 0,15 — 0,3 мг. Как и в случае пантотеновой кислоты, острый дефицит биотина возникает лишь при недостаточно эффективно работающей кишечной флоре, которая в норме производит биотин и обеспечивает потребности в нем организма хозяина.

Наряду с перечисленными соединениями, обеспечивающими потребности ферментативных превращений животных и человека, в малых количествах необходимы и некоторые другие вещества, также относимые к категории витаминов. Например, *витамин А* — ретинол (92 а)



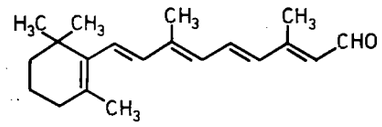
92а

необходим для образования *ретиналя*, который в сочетании с белком опсином образует родопсин — зрительный пурпур, участвующий в первичном акте поглощения света в фоторецепторных клетках глаза (палочках и колбочках). Ретинол окисляется до ретиналя с участием NAD^+ как окислителя с помощью фермента *ретинол дегидрогеназы*. Ретиналь в составе родопсина при действии света переходит из 11-*цис*-формы (92 б) в *транс*-форму (92 в):



11-*цис*-ретиналь

92 б

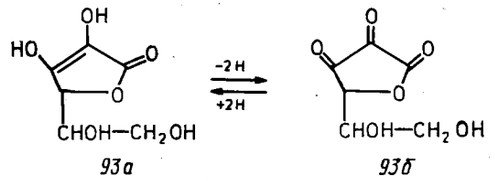


транс-ретиналь

92в

К витаминам традиционно относят также *аскорбиновую кислоту* (93 а) — *витамин С*, — которая не вырабатывается приматами, в том числе человеком, а также морскими свинками, но вырабатывается другими млекопитающими. Аскорбиновая кислота принимает участие в некоторых важных окислительных процессах, например в качестве второго донора электронов при окислении остатков

щается в дегидроаскорбиновую кислоту (93 б), которая восстанавливается до аскорбата с помощью специальной редуктазы:



93а *93б*

4.8. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Высокая каталитическая активность, специфичность и разнообразие ферментов, их способность осуществлять биохимические превращения в мягких условиях, в том числе близких к физиологическим, открывают перспективу их использования в качестве медицинских препаратов. Эти же особенности делают ферменты весьма привлекательными для осуществления различных технологических процессов.

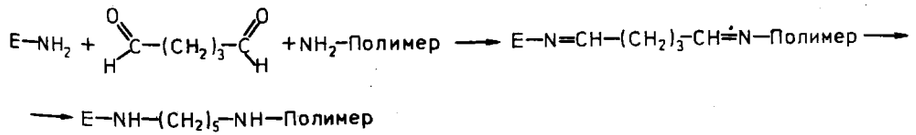
Пищеварительные ферменты уже ряд лет используют в качестве препаратов для компенсации их недостаточности при некоторых заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Лекарственная форма обычно содержит смесь ферментов – пепсина, трипсина, химотрипсина, α-амилазы, липазы. Протеолитические ферменты применяют для лечения осложненных ран и гнойно-некротических процессов, поскольку они гидролизуют денатурированные белки в омертвевших тканях, в то же время мало затрагивая нативные внутриклеточные белки, отделенные клеточными мембранами и менее чувствительные к действию протеаз благодаря компактной третичной структуре. Некоторые специальные протеазы, например фермент *фибринолизин*, катализирующий гидролиз *фибрина* — основного белка кровяного сгустка, образующегося при свертывании крови, используют для рассасывания тромбов, возникающих в кровяном русле и угрожающих закупоркой кровеносных сосудов.

Некоторые нуклеазы применяют для лечения вирусных заболеваний. Вирусные нуклеиновые кислоты в составе инфицированных клеток, особенно в период интенсивной репликации, транскрипции, биосинтеза вирусных белков, более доступны действию нуклеаз, чем нуклеиновые кислоты клетки, находящиеся преимущественно в виде комплексов с белками. Например, панкреатическая РНКаза применяется для лечения такого тяжелого заболевания, как клещевой энцефалит. Панкреатическая ДНКаза оказалась эффективной при лечении ряда заболеваний, вызываемых вирусом герпеса и аденовирусом. Вследствие сравнительно небольших размеров этих ферментов они не вызывают сильного иммунного ответа, что позволяет использовать сравнительно дешевые препараты, добываемые из поджелудочных желез крупного рогатого скота на мясокомбинатах. Аналогичное применение нашли нуклеазы и в борьбе с вирусами, поражающими животных. Например, эндонуклеаза из микроорганизма *Serratia marcescens* оказалась эффективной против вирусного паралича пчел, приносящего большой ущерб пчеловодству. В данном случае вследствие отсутствия у пчел разви[т] иммунной системы стало возможным применение бактериального препарата, который можно получить в практически неограниченном количестве на предприятиях микробиологической промышленности*.

На проведении реакций, катализируемых системами ферментов основаны многие крупномасштабные процессы в пищевой промышленности. Классическим примером является получение этанола и содержащих его продуктов винно-водочной промышленности, в ходе которого дрожжи с помощью набора ферментов гликолиза (см. § 8.2) превращают сахар в пируват и далее при действии пируват декарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы — в этиловый спирт. В основе применения различных видов молочнокислых бактерий в молочной промышленности лежит их способность осуществлять гликолиз и восстановление пирувата с помощью лактатдегидрогеназы.

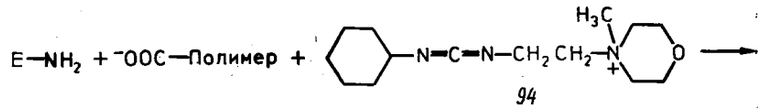
Использование очищенных индивидуальных ферментов в промышленности длительное время сдерживалось их дороговизной и невысокой устойчивостью. Ситуация стала изменяться с появлением ферментов, *иммобилизованных* на нерастворимых носителях. Применение ферментов, достаточно прочно связанных (иммобилизованных) с нерастворимыми полимерными материалами, прежде всего сделало процессы более технологичными. Появилась возможность использовать непрерывные процессы, основанные на пропускании раствора субстрата через колонку с иммобилизованным ферментом. Исчезла проблема отделения прореагировавших компонентов от фермента, резко повысилась эффективность использования фермента. Оказалось также, что связывание с носителем часто повышает термическую устойчивость фермента. В случае протеаз иммобилизация существенно ослабляет взаимодействие между отдельными молекулами фермента, приводящее к самопереариванию (автолизу).

Предложено большое число разнообразных методов иммобилизации, основанных как на физической сорбции, так и на ковалентном присоединении белков к носителям. Одним из наиболее полулярных химических приемов является обработка глутаровым альдегидом смеси фермента и полимерного носителя, содержащего аминогруппы. При этом молекулы глутарового альдегида образуют основания Шиффа с аминогруппами белка (в первую очередь ε-аминогруппами остатков лизина) и носителя, которые далее могут быть восстановлены до соответствующих аминов:

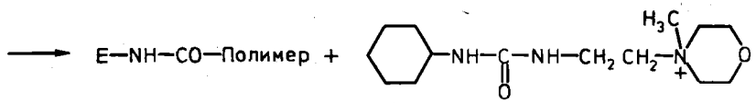


К носителям, содержащим карбоксильные группы, фермент может быть присоединен путем обработки каким-либо растворимым в воде карбодиимидом, например (94), что приводит к образованию амидной связи с аминогруппами белка:

*Применение нуклеаз в медицине и сельском хозяйстве разработано в институте цитологии и гинетики под руководством академика РАН Р.И. Салганика



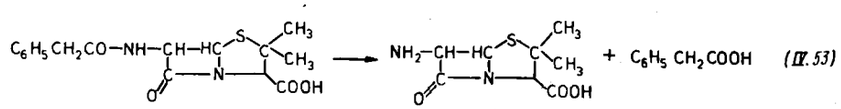
94



Поскольку у белков, как правило, имеется несколько однотипных аминокислотных остатков, в частности и остатков лизина, то разные молекулы фермента оказываются связанными с носителем через разные аминокислотные остатки. Если такой остаток расположен вблизи активного центра фермента или даже в самом активном центре, иммобилизация может привести к частичной или полной потере каталитической активности. Если же иммобилизация прошла по участку, удаленному от активного центра, то активность у фермента чаще всего остается. Поэтому в целом значительная часть иммобилизованных молекул частично или полностью сохраняет способность катализировать ферментативное превращение и наблюдается лишь падение суммарной активности фермента, ковалентно связанного с полимерным носителем. В связи с этим важной задачей является выбор такого типа иммобилизации, который приводит к наименьшим потерям активности.

В качестве примера реализованного с помощью иммобилизованных ферментов технологического процесса можно привести получение глюкозо-фруктозного сиропа из кукурузного крахмала. Этот сироп широко спользуется для получения кондитерских изделий. Процесс осуществляется с помощью трех иммобилизованных ферментов: α-амилазы, катализирующей гидролиз крахмала до олигосахаридов небольшой длины, *амилоглюкозидазы*, с помощью которой эти олигосахариды гидролизуются до глюкозы, и *глюкозоизомеразы**, которая превращает глюкозу в равновесную смесь глюкозы и фруктозы.

Второй пример — получение *6-аминопенициллановой кислоты* из природного пенициллина G (бензилпенициллина)



(IV.53)

с помощью иммобилизованной *пенициллинамидазы*. Образующаяся 6-аминопенициллановая кислота используется как сырье для получения широкого спектра полусинтетических пенициллинов, в том числе таких, которые действуют на микроорганизмы, устойчивые к природным пенициллинам. Этот пример особенно наглядно демонстрирует достоинство ферментативных методов, поскольку в данном случае в результате высокой специфичности фермента удается гидролизовать амидную связь, образуемую экзоциклической аминогруппой, не затрагивая существенно менее устойчивую амидную связь в β-лактамном цикле.

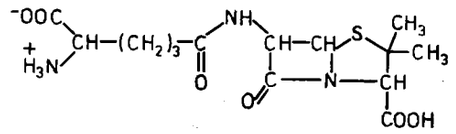
Применение иммобилизованных ферментов вместо растворимых оказалось в ряде случаев предпочтительным и при использовании ферментов в качестве медицинских препаратов. Такие препараты в силу большей устойчивости дольше удерживаются в организме (обладают пролонгированным действием). Кроме того, можно создавать разнообразные удобные для применения формы таких ферментов. Например, иммобилизация протеаз на целлюлозе позволяет получать обладающие протеолитической активностью повязки и тампоны, что удобно при использовании таких ферментов для заживления ран, язв и прочих поражений тканей.

Задачи

4.1. Изобразите схему превращения тирозина в адреналин. К каким классам относятся ферменты, катализирующие отдельные стадии? Найдите их в таблице ферментов.

4.2. Каков механизм превращения D-глюкуроната в L-идуронат? К какому классу относится фермент, осуществляющий это превращение? Дайте рациональное название фермента.

4.3. Известно, что 6-аминопенициллановая кислота является природным предшественником синтеза пенициллинов. Она синтезируется из L-α-аминоадипината, L-цистеина и L-валина. Промежуточным соединением в синтезе является изопенициллин N:



К каким классам относятся ферменты, катализирующие синтез 6-аминопенициллановой кислоты?

4.4. Изобразите схему синтеза пантотеновой кислоты из α-кетоизовалерата, формиата и β-аланина. Найдите по таблице ферменты, катализирующие отдельные стадии синтеза пантотеновой кислоты и ее дальнейшего превращения в кофермент A.

4.5. Изобразите полную схему взаимопревращений одноуглеродных производных тетрагидрофолата с учетом образования N10-формил-THF из формиата и THF.

*Этот фермент по рекомендованной номенклатуре называется ксилозоизомеразой, пос-

ГЛАВА 5

МАТРИЧНЫЙ БИОСИНТЕЗ БИОПОЛИМЕРОВ

Главным отличием биосинтеза белков и нуклеиновых кислот от других биохимических превращений является участие в каждом акте удлинения синтезируемой цепи полимера наряду с соответствующим ферментом и субстратами (растущей полимерной цепью и очередным, присоединяемым мономером) специальной молекулы нуклеиновой кислоты, с помощью которой в этом акте отбирается один из альтернативных мономеров. Эта нуклеиновая кислота может рассматриваться как линейная последовательность кодирующих элементов, которыми в случае биосинтеза ДНК и РНК являются отдельные нуклеотидные звенья, а в случае биосинтеза белка — тринуклеотиды, кодоны информационной РНК.

На ранних этапах исследований и обсуждений путей построения новых молекул ДНК и РНК по информации, содержащейся в последовательности нуклеотидов ДНК, а затем и построения новых полипептидных цепей по информации, содержащейся в молекулах информационной РНК, эти процессы сравнивали с получением отпечатков с типографских матриц. Поэтому запрограммированный с помощью нуклеиновых кислот процесс сборки новых цепей биополимеров называют *матричным биосинтезом*, а сами молекулы нуклеиновых кислот, используемые как программы в матричном биосинтезе,— *матрицами*. Как будет видно при рассмотрении конкретных биохимических механизмов биосинтеза белков и нуклеиновых кислот, этот термин не вполне удачен.

Реально системы, в которых происходит синтез биополимеров с нерегулярным запрограммированным чередованием мономерных остатков, функционируют таким образом, что несущая информацию нуклеиновая кислота протягивается через некоторое "считывающее устройство" — полимеразу нуклеиновых кислот или рибосому. Более корректным было бы сравнение таких систем не с типографской матрицей, а с магнитофоном, мимо головки которого проходит лента с записанной на ней информацией. Тем не менее термин "матричный биосинтез" в настоящее время общепринят.

5.1. ДНК — ОСНОВНОЙ НОСИТЕЛЬ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ

Как уже говорилось в § 1.1, ДНК является первичным носителем наследственной информации у всех живых организмов. Это означает, что в структуре молекул ДНК организма записана в виде последовательности нуклеотидов вся программа, необходимая для жизнедеятельности клетки, ее реакции на различные внешние сигналы, ее развития в случае, если она подлежит дифференцировке, ее подготовки к предстоящему делению. Все клеточные ДНК являются двунитевыми структурами, образованными комплементарными последовательностями нуклеотидов (см. § 3.7).

У прокариот наследственная программа в основном или полностью представлена одной кольцевой молекулой ДНК, состоящей из нескольких миллионов пар нуклеотидов. В некоторых случаях часть информации содержится в сравнительно небольших, в несколько тысяч пар нуклеотидов, кольцевых ДНК, называемых *плазмидами*. Плазмиды в клетках прокариот могут быть представлены несколькими копиями и даже несколькими десятками копий.

У эукариот ДНК в основном сосредоточена в хромосомах, причем, по-видимому, в каждой хромосоме содержится одна двунитевая ДНК, размер которой может достигать сотен миллионов пар нуклеотидов. Например, у человека наследственная программа оценивается в $3 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов и сосредоточена в 23 хромосомах, так что в среднем на каждую хромосомную ДНК приходится более ста миллионов пар нуклеотидов. ДНК в хромосомах существует в виде сложного агрегата с большим набором белков — хроматина, описанного в § 3.8. Сравнительно небольшие молекулы ДНК, как правило, в несколько десятков тысяч пар нуклеотидов, содержатся в митохондриях. Эти ДНК несут программы для синтеза многих митохондриальных РНК и нескольких митохондриальных белков. Автономные наследственные программы, на порядок большего размера, чем у митохондрий, имеют хлоропласты фотосинтезирующих организмов. Размеры ДНК для некоторых вирусов и живых организмов приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1. **Размеры ДНК некоторых представителей прокариот и эукариот**

Источники ДНК	Число пар оснований	Источники ДНК	Число пар нуклеотидов
Вирусы и бактериофаги:		Эукариоты:	
SV40	5100	дрожжи	13 500 000
бактериофаг T4	110 000	дрозофила	105 000 000
бактериофаг T7	39 936	человек	2 900 000 000
Бактерии:		Хлоропласты	120 000 ÷190 000
микоплазма	760 000	Митохондрии:	
Escherichia coli	4 000 000	человека	16 569
		дрожжей	84 000

Несмотря на то, что нуклеиновые кислоты были открыты более ста лет назад, их фундаментальная роль как носителей наследственной информации была осознана лишь в середине XX в. Решающее значение для этого имели результаты, полученные Эвери с сотр. и опубликованные в 1944 г. Было показано, что ДНК из убитых клеток бактерий *Diplococcus pneumoniae*, вызывающих пневмонию, при помещении ее в среду с непатогенными, т. е. не способными вызывать инфекцию, бактериями того же вида превращает (трансформирует) часть клеток в патогенные. При этом трансформированные клетки передают свойство патогенности следующим поколениям, т. е. с помощью ДНК в них вводится новая насле-

дуемая информация. Вслед за этим в 1952 г. Херш и Чейз опубликовали результаты исследований, в которых было показано, что при заражении клеток *E.coli* бактериофагом Т4 в клетки проникает только ДНК фага и это достаточно для воспроизведения внутри клетки фагового потомства — как молекул ДНК, так и всего набора свойственных фагу белков. Весь дальнейший ход развития генетики и биохимии полностью подтвердил положения, вытекавшие из этих экспериментов, а именно, что двунитевая ДНК является носителем информации у всех клеточных организмов и у ряда вирусов. В то же время у большого числа вирусов носителями наследственной информации могут быть однонитевые молекулы ДНК и как одно-, так и двунитевые молекулы РНК. Особенности наследственных программ таких вирусов рассмотрены в § 5.7.

Процессы в живых организмах, происходящие с непосредственным участием их ДНК, можно разделить на две основные группы. Одна группа — это использование записанной в молекулах ДНК информации для производства молекул РНК, с помощью которых, в свою очередь, синтезируется весь набор белков, свойственных данному организму. Этот процесс приводит к выражению или, как чаще говорят, к *экспрессии генетической информации*. Вторая группа процессов связана с сохранением, размножением, реорганизацией и изменением информационного содержания молекул ДНК.

Как уже говорилось в § 1.1 и 2.3 , ДНК программирует работу ферментов РНК-полимераз, которые катализируют синтез новых молекул РНК из нуклеотидов с последовательностью, комплементарной одной из цепей программирующей ДНК. Этот процесс называют транскрипцией. Конечным итогом этого процесса является образование информационных, рибосомных, транспортных РНК, а также ряда не очень больших молекул РНК со специальными, далеко не всегда установленными функциями. Образующийся при этом первичный транскрипт в большом числе случаев не является готовой к выполнению своих функций молекулой РНК, а подвергается дополнительной серии превращений, объединяемых общим термином *процессинг*. Эти превращения могут заключаться в отщеплении от первичного транскрипта определенных олигонуклеотидов с одного или обоих концов, в химической модификации некоторых мономерных звеньев транскрипта, в присоединении, уже без непосредственного участия ДНК, дополнительных остатков нуклеотидов.

Особенно следует отметить наличие в первичных транскриптах эукариот больших вставок от нескольких десятков до тысяч мономерных звеньев, так называемых *интронов*, которые подлежат выщеплению в процессе созревания РНК. Разделяемые интронами участки, сохраняющиеся в зрелой РНК, в этом случае называют *экзонами*. Выщепление интронов из первичных транскриптов называют *сплайсингом*. Он проходит или при участии специальных ферментов, или в некоторых случаях самопроизвольно вследствие наличия в составе интронов особых последовательностей, катализирующих расщепление цепи в определенных точках. Здесь проявляется способность самих молекул РНК выступать в качестве катализаторов расщепления рибонуклеотидных цепей, т. е. служить ферментами. Такие построенные из РНК ферменты получили название *рибозимов*.

Синтез РНК должен начинаться с вполне определенных участков ДНК. Кроме того, он должен быть управляемым — включаться в одних и выключаться в других физиологических ситуациях. В связи с этим на ДНК имеются специальные области, с которых информация в виде молекул РНК не считывается и которые предназначены для связывания РНК-полимераз перед началом транскрипции или для взаимодействия со специальными молекулами, участвующими в регуляции процесса транскрипции. Такие области получили название нетранскрибируемых участков ДНК. Некоторые наиболее четко установленные сведения об этих областях приведены в § 5.5 при рассмотрении процессов транскрипции и при описании регуляции транскрипции (см. § 10.3).

Каждая программа, записанная на ДНК, может быть многократно транскрибирована, а каждая молекула мРНК, полученная при транскрипции определенного гена, может многократно участвовать в программировании трансляции. Поэтому в принципе клетке достаточно иметь по одной программе для каждого белка, каждой из рибосомных и транспортных РНК. Практически же некоторые, наиболее широко используемые программы, особенно у эукариот, имеются в виде нескольких или даже многих копий. Например, хромосомы эукариот содержат много десятков программ для рибосомных РНК и десятки — для каждой из всего набора транспортных РНК.

Даже эта достаточно сложная картина информационного содержания ДНК не является исчерпывающей. Полное представление о всем богатстве информации, заложенной в этих гигантских молекулах, еще подлежит выявлению. По-видимому, оно начнет постепенно вырисовываться по мере появления данных о полной структуре генома эукариот и в том числе генома человека, на установление которой направлены в настоящее время усилия огромной армии ученых всего мира.

Способность ДНК к точному самоудвоению при произвольной последовательности нуклеотидов в ее цепях заложена в самом принципе построения ДНК в виде двунитевой структуры со взаимно комплементарными последовательностями. Это означает, что каждая из цепей содержит полную информацию о строении противоположной цепи. Поэтому при расхождении цепей у каждой сохраняется информация, необходимая для воссоздания из мономеров новой цепи, идентичной ушедшей.

Рассмотренный принцип построения новых цепей ДНК на разошедшихся цепях исходной двунитевой ДНК (*репликация* ДНК) реализуется с помощью ферментов ДНК-полимераз. Биохимические процессы, лежащие в основе репликации ДНК, рассмотрены в § 5.4. Согласно изложенному принципу удвоение происходит так, что в составе новой двунитевой структуры содержится одна полностью сохранившаяся материнская цепь и одна вновь синтезированная дочерняя. Такую схему синтеза ДНК называют *полуконсервативной*.

Впервые полуконсервативный принцип репликации был экспериментально подтвержден в изящных экспериментах Мезельсона и Сталя. Бактерии *E.coli* были выращены на среде, содержащей в качестве единственного источника азота соли $^{15}NH_4^+$. Естественно, что ДНК таких бактерий была построена из тяжелого изотопа азота. Полученные клетки были перенесены на среду с легким изотопом азота ^{14}N, а ДНК, выделенная из клеток, прошедших один или два цикла делений на этой среде, была подвергнута ультрацентрифугированию в градиенте плотности хлорида цезия (см. § 7.3). В такой системе разделение молекул полимеров проходит по их плавучей плотности, которая в случае молекул идентичного химического строения однозначно определяется их изотопным составом. Схема и результаты эксперимента приведены на рис. 43. В полном соответствии с полуконсервативной схемой репликации ДНК из бактерий, прошедших один цикл

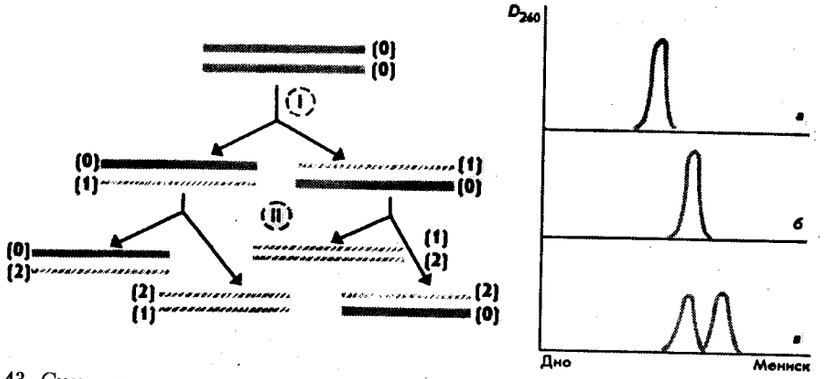


Рис. 43. Схема эксперимента Мезельсона и Сталя (слева) и профиль оптической плотности при 260 нм (D_{260}) вдоль центрифужной ячейки при равновесном центрифугировании в градиенте концентрации CsCl ДНК из бактерий, выращенных в среде с $^{15}NH_4^+$ (*а*), и ДНК из первой (*б*) и из второй (*в*) генерации, полученных при последующем выращивании на среде с $^{14}NH_4^+$ (справа). Цифры 0, 1, 2 обозначают соответственно исходные цепи ДНК и цепи, синтезированные в первом и втором циклах репликации

размножения на среде с ^{14}N, была представлена одной полосой, соответствовавшей 50%-ному содержанию каждого из изотопов. ДНК, прошедшая два цикла репликации, представлена двумя полосами: одной, соответствовавшей 50%-ному содержанию каждого из изотопов, и второй, соответствовавшей 100%-ному содержанию изотопа ^{14}N. Первый результат свидетельствовал, что при делении нити тяжелой ДНК разошлись и попали по одной в каждую из дочерних клеток. Второй результат показал сохранение исходных нитей, построенных из ^{15}N, в половине клеток второй генерации.

Молекулы ДНК живых организмов неизбежно подвергаются действию различных повреждающих факторов: химических реагентов, ультрафиолетового облучения и более жесткой радиации. Двунитевая структура ДНК существенно уменьшает опасность необратимого повреждения наследственной информации. Если повреждение происходит на каком-то участке в пределах одной цепи, а вторая цепь на этом же участке оказывается незатронутой, то сохранившаяся в ней информация дает принципиальную возможность исправить повреждение. В клетках имеется большая группа ферментов, осуществляющих *репарацию* ДНК, т. е. занятых исправлением нарушений, возникших в наследственной программе на одной из цепей ДНК. Детальное рассмотрение системы репарации выходит за рамки данного курса. Общую, наиболее распространенную стратегию репарации можно рассмотреть на примере репарации повреждений, возникающих при действии азотистой кислоты, которая образуется в природе в результате грозовых разрядов в атмосфере и приносится на землю сопутствующими ливневыми дождями*.

*В настоящее время система репарации генетических повреждений, возникающих под действием азотистой кислоты, приобретает особое значение в связи с широким использованием нитритов в качестве удобрений, консервантов в пищевой промышленности и поступлением в атмосферу значительных количеств NO_2 вместе с выхлопными газами.

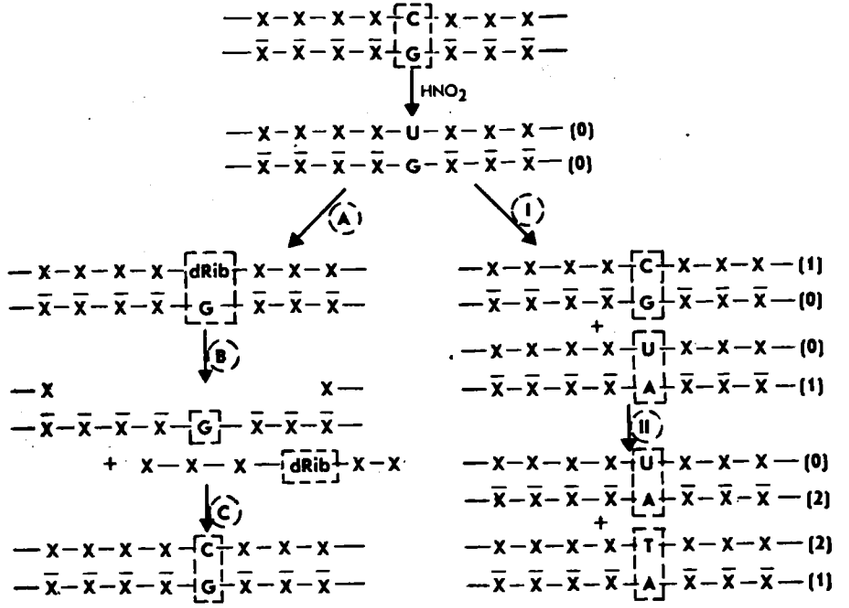
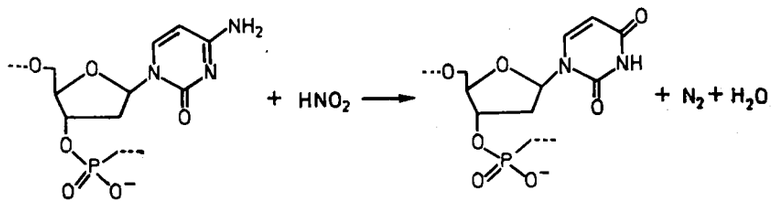


Рис. 44. Схема альтернативных биохимических превращений ДНК в точке превращения цитозина в урацил (X и $\overline{X}$ — произвольные пары комплементарных нуклеотидов; символ d всюду опущен; dRib – фрагмент дезоксирибозы, лишенный гетероцикла):

левая часть схемы – репарация: A – действие урацил–ДНК–гликозидазы; B – действиеэндонуклеазы; C – действие репарирующей ДНК–полимеразы. Правая часть – возникновение мутации: I и II – циклы репликации. Во втором цикле показан только результат репликации измененной ДНК. Цифры (0), (1), (2) обозначают соответственно исходную цепь после химического превращения, цепи, синтезированные в первом и втором циклах репликации

Азотистая кислота осуществляет дезаминирование экзоциклических аминогрупп гетероциклов, например приводит к превращению остатков цитозина в остатки урацила по реакции



(*Г.1*)

В результате такого превращения в ходе последующей репликации на измененной нити на фрагменте, содержащем остаток урацила, произойдет отбор аденилового нуклеотида, т. е. возникнет дочерняя цепь, в которой вместо гуанина на одном звене окажется аденин. Таким образом, изменится информационное содержание молекул ДНК в одной из дочерних клеток. Во избежание таких повреждений в системе ферментов репарации существует специальный фермент, урацил-ДНК-гликозидаза, катализирующий гидролиз гликозидной связи между

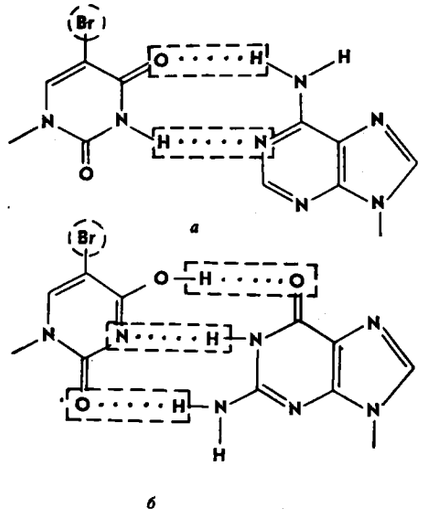


Рис. 45. Комплементарные взаимодействия кетоформы бромурацила с аденином (*а*) и гидроксиформы с гуанином (*б*)

урацилом и остатком дезоксирибозы в молекулах ДНК. В результате такого гидролиза в ДНК появляется фрагмент дезоксирибозы, не содержащей гетероцикла. Такие фрагменты получили название, в зависимости от их происхождения, апиримидиновых или апуриновых фрагментов. Участки, в состав которых входят такие фрагменты, подвергаются действию специальной эндонуклеазы, которая гидролитически выщепляет из поврежденной цепи олигонуклеотид, содержащий апуриновый/апиримидиновый фрагмент (*апурино/апиримидиновая эндодезоксирибонуклеаза*). На месте модифицированного участка полинуклеотидной цепи возникает брешь, которая застраивается с помощью работающей в системе ферментов репарации ДНК-полимеразы по информации, сохранившейся в неповрежденной нити, в результате чего полностью восстанавливается исходная структура участка (рис. 44).

Система репарации не является абсолютно совершенной, и с некоторой частотой возникают наследуемые изменения в структуре ДНК, подобно описанным при рассмотрении действия азотистой кислоты. Такие изменения получили название *мутаций*. Вещества, способствующие возникновению мутаций, называют *мутагенами*. В качестве еще одного примера мутагена можно привести 5-бромдезоксиуридин (рис. 45), который, будучи добавлен в среду для выращивания микроорганизмов или эукариотических клеток или при введении в живые организмы, может превращаться под действием ферментов в соответствующий нуклеотид и участвовать в процессе репликации. У бромдезоксиуридина по сравнению с уридином и тимином таутомерное равновесие между кето- и гидроксиформами в значительно большей мере смещено в сторону последней, хотя кетоформа остается доминирующей. Как видно из рис. 45, кетоформа сохраняет сродство к аденину, поэтому фрагменты бромдезоксиуридина преимущественно включаются в участки, на которых должен находиться дезокситимидин. Однако получающиеся матрицы из-за повышенного содержания гидрокситаутомера при участии в построении комплементарной цепи могут способствовать отбору в точке нахождения фрагмента бромдезоксиуридина не аденилового, а гуанилового нуклеотида. На месте исходной пары A·T образуется пара GBr^{5}U. При последующем цикле репликации цепь, содержащая фрагмент дезоксигуанозина, будет способствовать отбору цитидилового нуклеотида, в результате чего образуется пара G·C. Схема возникновения такой пары на месте ранее существовавшей пары A·T представлена на рис. 46. На схеме также показано, что с определенной вероятностью остаток дезоксигуанозина может отобрать не цитидиловый, а бромдезоксиуридиловый нуклеотид.

Наряду с описанными так называемыми точечными мутациями, приводящими

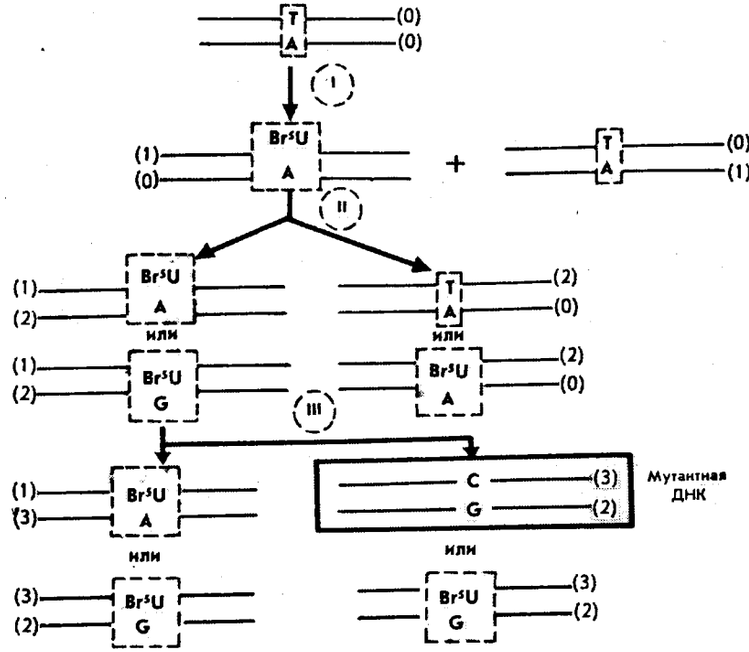


Рис. 46. Схема замены пары T·A на пару C·C при репликации в присутствии наряду с тимидином его аналога 5-бромдезоксиуридина (Br^{5}U); символ d всюду опущен

к замене одних пар нуклеотидов другими, могут происходить и более сложные события: выпадение одного или нескольких нуклеотидных звеньев — *делеция*: вставки дополнительных нуклеотидов — *инсерция*. Пути их возникновения рассматриваются в специальных курсах молекулярной биологии и молекулярной генетики. Если возникшие мутации сопровождаются появлением полезных для организма признаков, то при благоприятных условиях они могут закрепиться в популяции организмов данного вида и дать носителям этих мутаций определенные преимущества при естественном отборе. Мутации в сущности являются первичным, происходящим на молекулярном уровне событием, лежащим в основе изменчивости живых организмов, которая в сочетании с естественным отбором является главной движущей силой эволюции.

Возникающие под действием различных факторов мутации приводят иногда к появлению у живых организмов полезных для человека признаков. Такие организмы могут быть использованы как исходный материал для селекции при выведении новых штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных с ценными характеристиками. Облучение клеток микроорганизмов или семян растений рентгеновскими лучами или обработка их химическими мутагенами резко повышает выход мутаций и создает особенно богатый материал для селекции. В то же время мутации в сочетании с естественным отбором позволяют микроорганизмам и клеточным популяциям приспосабливаться к присутствию в окружающей их среде неблагоприятных для их роста и размножения веществ, в том числе

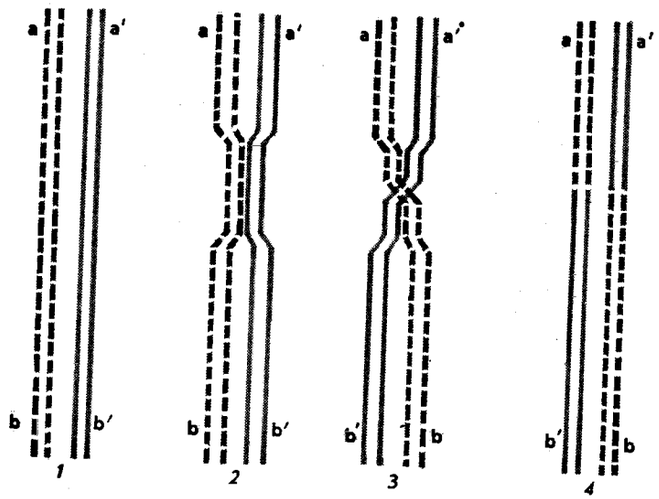


Рис. 47. Схема гомологичной рекомбинации ДНК:

1 – исходные двунитевые структуры; *2* – структура с четырехнитевым фрагментом; *3* – та же структура после рекомбинации; *4* – разошедшиеся двунитевые структуры после рекомбинации

лекарственных препаратов. Это, в частности, проявляется в возникновении и отборе патогенных микроорганизмов, устойчивых к определенным антибиотикам, и в разрастании популяций клеток злокачественных опухолей, устойчивых к действию противоопухолевых препаратов при применении последних в качестве химиотерапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

Рассмотренные процессы — репликация, транскрипция, репарация и мутагенез — не исчерпывают всего многообразия событий, происходящих с молекулами ДНК в ходе выполнения ими функций носителя наследственной информации. Наряду с ними молекулы ДНК могут претерпевать различные перестройки. Например, установлено, что в зародышевых клетках участки гена, кодирующие вариабельные и константные области цепей иммуноглобулинов, расположены значительно дальше друг от друга, чем в зрелых В-лимфоцитах, продуцирующих антитела. Это означает, что в ходе дифференцировки стволовых клеток в направлении, приводящем к формированию В-лимфоцитов, происходит сближение соответствующих участков генов, т. е. перестройка молекул ДНК в хромосомах, несущих гены иммуноглобулинов. При дифференцировке тех же стволовых клеток, приводящей к формированию эритроцитов, у млекопитающих на заключительной фазе вообще происходит полная элиминация ДНК.

Среди различных перестроек, претерпеваемых молекулами ДНК в составе живых организмов, особенно важной и повсеместно распространенной является *гомологичная рекомбинация*. Суть этого процесса состоит в том, что две идентичные или близкие по своей первичной структуре двунитевые ДНК объединяются в единую четырехнитевую структуру, в которой оказываются сближенными достаточно протяженные идентичные участки обеих исходных структур, и эти структуры обмениваются своими фрагментами. Схема такого обмена приведена на рис.47. Видно, что фрагмент *a*, находившийся до акта рекомбинации в составе двунитевой ДНК вместе с фрагментом *b*, оказывается связанным с фрагментом *b′*, принадлежащим до этого второй двунитевой ДНК, а фрагмент *a′* этой ДНК, наоборот, объединяется с фрагментом *b* первой из двунитевых структур.

Ферментные системы клеток, с помощью которых осуществляется гомологичная рекомбинация, и тем более лежащие в основе рекомбинации молекулярные события еще недостаточно изучены. Основные сведения о процессах рекомбинации получены генетическими методами путем наблюдения за возникновением новых комбинаций наследуемых признаков в потомстве. Если фрагменты *a*, *a′* и *b*, *b′* попарно неидентичны и несут различающуюся генетическую информацию, то после рекомбинации должны появиться особи, обладающие одновременно признаками, соответствующими информации, содержавшейся во фрагментах *a* и *b′*, и/или признаками, определяемыми информацией, свойственной фрагментам *a′* и *b*.

В качестве примера можно привести результаты первого эксперимента, в котором была доказана рекомбинация у бактерий. Бактериальные клетки, содержащие в норме одну двунитевую ДНК, в некоторых специальных случаях могут объединяться попарно (конъюгировать) с передачей части ДНК от бактерии-донора бактерии-реципиенту. Такая конъюгация является проявлением полового процесса у бактерий, причем клетки-реципиенты рассматриваются как женские, а клетки-доноры — как мужские клетки. В клетке-реципиенте в таком случае возможна гомологичная рекомбинация. В описываемом эксперименте использовали два штамма *E. coli*. Один штамм имел дефект в одном из генов, ответственных за биосинтез аминокислот изолейцина и треонина, и мог расти только на среде, содержащей эти аминокислоты. У другого штамма была повреждена система биосинтеза метионина и витамина биотина, и для роста этого штамма была необходима среда, содержащая эти компоненты. После смешения суспензий этих бактерий в условиях, благоприятствующих конъюгации и тем самым рекомбинации, среди последующих генераций были обнаружены потомки, способные расти на среде, лишенной всех четырех перечисленных соединений. Это означает, что в некоторых клетках произошла рекомбинация с образованием ДНК, получившей от одного из исходных штаммов неповрежденный участок, ответственный за синтез треонина и изолейцина, а от другого — участок, обеспечивающий синтез метионина и биотина.

Рекомбинация у эукариотических клеток была выявлена генетическими методами, а в отдельных случаях и путем наблюдения форм хромосом. Этот процесс происходит при созревании половых клеток, на первой фазе которого две пары хромосом, образовавшиеся в результате предшествующей репликации, вместо того чтобы разойтись по двум дочерним клеткам, как это имеет место при обычном клеточном делении — митозе, предварительно объединяются в единую структуру некоторыми гомологичными сегментами. Это создает благоприятные условия для гомологичной рекомбинации, которая у эукариот, в первую очередь у дрозофилы, была открыта задолго до выяснения рекомбинации у бактерий и получила название *кроссинговера*. Рекомбинация сама по себе не создает новых генов, однако в результате нее возникают новые комбинации признаков, которые могут оказаться весьма существенными как при естественном отборе, так и в селекционных работах.

5.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Информация о последовательности аминокислот в полипептидной цепи белка, программируемого информационной РНК, записана в молекуле этой РНК, а следовательно, и в соответствующем участке одной из цепей ДНК, в виде последовательности кодирующих эти аминокислоты тринуклеотидных фрагментов — кодонов. Необходимость как минимум трех нуклеотидов для кодирования каждой из 20 аминокислот, формирующих первичную полипептидную цепь при биосинтезе белков, вытекает из очевидных арифметических соображений: ни каждый из четырех нуклеотидов по отдельности, ни 16 мыслимых динуклеотидных фрагментов не могут однозначно кодировать 20 аминокислот. Соответствие между 64 кодонами и 20 аминокислотами, участвующими в биосинтезе полипептидных цепей на рибосомах, получило название генетического кода. Первое доказательство самого факта существования генетического кода и первый шаг к его расшифровке были получены в эксперименте Ниренберга и Маттеи. Эти авторы показали, что на рибосомах в присутствии всех компонентов, необходимых для биосинтеза белка, и построенной полностью из фрагментов уридин-5′-монофосфата полиуридиловой кислоты в качестве информационной РНК, синтезируется полифенилаланин. Отсюда следовало, что фенилаланин кодируется несколькими, скорее всего тремя остатками уридиловой кислоты, т. е. кодоном для фенилаланина является тринуклеотид UUU (в этом параграфе в табл. 5.2 символы межнуклеотидных фосфатов или заменяющие их черточки опущены).

Полная расшифровка генетического кода стала возможной в результате успехов, достигнутых в работах Корана по синтезу олигорибонуклеотидов, что позволило получить весь набор кодонов. Было найдено, что в присутствии каждого из кодонов, за исключением кодонов UAA, UAG и UGA, с рибосомами связывается тРНК, несущая определенную аминокислоту. Этим все кодоны были приведены в соответствие с одной из 20 аминокислот. В дальнейшем сравнение первичных структур многих ДНК или мРНК и независимо установленных структур программируемых ими белков подтвердили правильность проведенной расшифровки кода и продемонстрировали его практически полную универсальность. Найдены лишь немногочисленные примеры организмов, у которых используется генетический код, незначительно отличающийся от универсального. Полная структура генетического кода приведена в табл. 5.2.

Уже из соотношения 64 кодона на 20 аминокислот следует, что код должен быть вырожденным, т. е. одной аминокислоте должно соответствовать несколько кодонов. Как видно из табл. 5.2, распределение аминокислот по кодонам весьма неравномерно. Трем аминокислотам — лейцину, серину и аргинину — соответствует по шесть кодонов, пяти аминокислотам — глицину, аланину, валину, пролину и треонину — по четыре, изолейцину — три кодона, лизину, аспартату, аспарагину, глутамату, глутамину, фенилаланину, тирозину, гистидину и цистеину — по два, а метионину и триптофану — по одному кодону. Три кодона — UAA, UAG и UGA — не соответствуют ни одной из аминокислот. Они являются сигналами для прекращения синтеза полипептидной цепи: их называют *кодонами-терминаторами*. В восьми случаях природа кодируемой аминокислоты однозначно определяется первыми двумя нуклеотидами кодона: UC — серин, AC — треонин, CU — лейцин, GU — валин, CC — пролин, CG — аргинин, GC — аланин и GG — глицин. В большинстве остальных случаев природа кодируемой аминокислоты определяется

Таблица 5.2. Генетический код

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

первыми двумя нуклеотидами кодона и тем, является ли третий нуклеотид пуриновым или пиримидиновым. Например, кодоны AAA и AAG кодируют лизин, а кодоны AAU и AAC — аспарагин. Исключениями из этих общих правил являются изолейцин, кодируемый тремя тринуклеотидами AUU, AUC и AUA, метионин, кодируемый тринуклеотидом AUG, и триптофан, кодируемый тринуклеотидом UGG.

Расшифровка генетического кода открыла перед исследователями ряд новых интересных возможностей. Информация, получаемая при установлении первичной структуры генов, может с помощью генетического кода легко переводиться в информацию о структуре кодируемого белка. Это в ряде случаев весьма существенно, так как техника секвенирования ДНК на сегодняшний день существенно проще, чем для белков. Правда, для такого перевода необходимо решить несколько нетривиальных задач. Во-первых, нужно правильно разбить установленную нуклеотидную последовательность на кодоны. Во-вторых, нужно найти положение кодона, соответствующего первой аминокислоте полипептидной цепи.

Наконец, в случае эукариотических ДНК нужно выяснить положение интронов.

Из трех возможных разбиений нуклеотидной последовательности на кодоны выбрать правильное часто удается по наличию при этом разбиении открытой рамки считывания — последовательности кодонов, среди которых на большом протяжении не встречается кодонов-терминаторов. Для случайной последовательности вероятность появления в определенном месте кодона-терминатора достаточно велика — 3/64, или около 0,05. Для определения положения первого кодона, участвующего в программировании полипептидной цепи, можно определить в исследуемом белке методом Эдмана несколько аминокислотных остатков с N-конца и затем найти на полинуклеотиде адекватную последовательность кодонов. В случае наличия или подозрений о наличии интронов лучше всего иметь дело не с геном, а с ДНК, комплементарной зрелой информационной РНК, в которой в результате сплайсинга участки, соответствующие интронам и поэтому не принимающие участия в кодировании полипептидной цепи, отсутствуют. Такую комплементарную ДНК можно получить с помощью так называемой *обратной транскрипции* — матричного синтеза ДНК по информации, содержащейся в мРНК с помощью ферментов обратной транскрипции, содержащихся в некоторых вызывающих опухоли вирусах, например в вирусе птичьего миелобластоза.

Большие успехи в синтезе олиго- и полидезоксирибонуклеотидов в сочетании со знанием генетического кода позволяют химически синтензировать гены для произвольного белка с известной первичной структурой. Эти гены могут быть использованы для синтеза этого белка бактериями или клеточными культурами после введения его в клетки методами генетической инженерии (см. § 7.11).

5.3. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МАТРИЧНОГО БИОСИНТЕЗА

Тремя главными матричными процессами, присущими всем без исключения живым организмам, являются репликация ДНК, транскрипция и трансляция. Репликация ДНК происходит с участием ферментов ДНК-полимераз. Роль матриц играют разделенные цепи двунитевой материнской ДНК. Субстратами являются дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфаты. Транскрипция осуществляется с помощью ферментов РНК-полимераз. Матрицей служит одна из нитей двунитевой ДНК, а субстратами — рибонуклеозид-5′-трифосфаты. Трансляция происходит на рибосомах с участием информационной РНК (мРНК) в качестве матрицы и аминоацил-тРНК в качестве субстратов. Кроме того, при заражении клеток вирусами, у которых наследственная информация содержится в молекулах вирусных РНК, в клетках начинается запрограммированный этими РНК синтез ферментов, называемых обычно РНК-репликазами, которые катализируют биосинтез РНК, используя в качестве матриц молекулы РНК. Некоторые вирусы, вызывающие злокачественные новообразования, содержат ферменты, катализирующие обратную транскрипцию — синтез ДНК с использованием в качестве матриц молекул РНК. Эти ферменты часто называют *обратными транскриптазами* или ревертазами. Более строгие названия двух последних групп ферментов соответственно — *РНК-зависимая РНК-полимераза* и *РНК-зависимая ДНК полимераза*.

Синтез полимерной цепи складывается из трех основных элементов: инициации, элонгации и терминации.

Инициацией называют процесс, в котором образуется первая связь между

мономерными звеньями создаваемой полимерной цепи. Истинная инициация отличается от остальных стадий биосинтеза биополимера тем, что в ней принимают участие две молекулы мономера, в то время как на всех дальнейших стадиях одним из субстратов является растущая цепь полимера, т. е. олигомер или полимер. Ни в случае ДНК, ни в случае мРНК инициация, как правило, не начинается непосредственно в точке физического начала полимерной цепи матрицы. На матрице имеется специальный сигнал или группа сигналов, позволяющие ферменту опознать кодирующий элемент, с которого начинается информация о синтезируемой цепи биополимера.

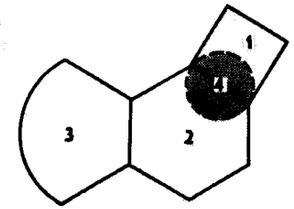


Рис. 48. Схема активного центра матричного фермента:

1 – участок связывания кодирующего элемента матрицы; *2* – участок связывания мономера; *3* – участок связывания конца растущей цепи; *4* – область опознавания мономера кодирующим элементом

Чтобы синтез прекратился в определенном месте, необходимо, чтобы в этом месте присоединение очередного мономерного звена оказалось невозможным. Поскольку конец продукта чаще всего не соответствует концу матрицы, на ней должен быть специальный сигнал, обеспечивающий прекращение роста цепи, т. е. *терминацию*. В предыдущем параграфе уже говорилось, что в случае биосинтеза белка такими сигналами являются специальные кодоны-терминаторы.

При нормальном развитии процесса на каждый акт инициации и терминации биосинтеза приходится большое число актов *элонгации*, т. е. соединения очередного мономера с растущей цепью. Каждый акт элонгации проходит в активном центре соответствующей полимеразы нуклеиновых кислот или рибосомы, причем его непосредственными участниками являются концевая группа синтезируемого полимера, кодирующий элемент матрицы и очередная молекула мономера. Все эти участники должны быть закреплены определенным образом в активном центре полимеразы или рибосомы. Вытекающая из этих соображений схема активного центра матричного фермента представлена на рис. 48. По аналогии с активными центрами других, более просто устроенных ферментов можно ожидать, что такой активный центр должен быть уникальным.

Каждый акт элонгации цепи должен начинаться с отбора субстрата (рис. 49). Скорее всего этот процесс происходит путем перебора всех альтернативных субстратов, присутствующих в системе. Для этой цели активный центр должен обладать сродством к универсальной части субстратов, которая имеется у всех типов мономеров. Так, у нуклеозит-5′-трифосфатов такой частью является трифосфатный фрагмент и остаток рибозы или дезоксирибозы. Попадание в активный центр нужного субстрата, опознаваемого кодирующим элементом матрицы, является сигналом для осуществления ферментативной реакции соединения мономерного фрагмента с концом синтезируемой полимерной цепи. В чем заключается природа этого сигнала, до настоящего времени не установлено. Можно лишь полагать, что взаимодействие мономера с кодирующим элементом, например образование водородных связей между комплементарными гетероциклами субстрата и матрицы, вызывает конформационное изменение, приводящее к нужной ориентации реагирующих групп и соответствующих групп каталитического центра фермента или рибосомы.

После того как присоединился очередной мономер, последний становится

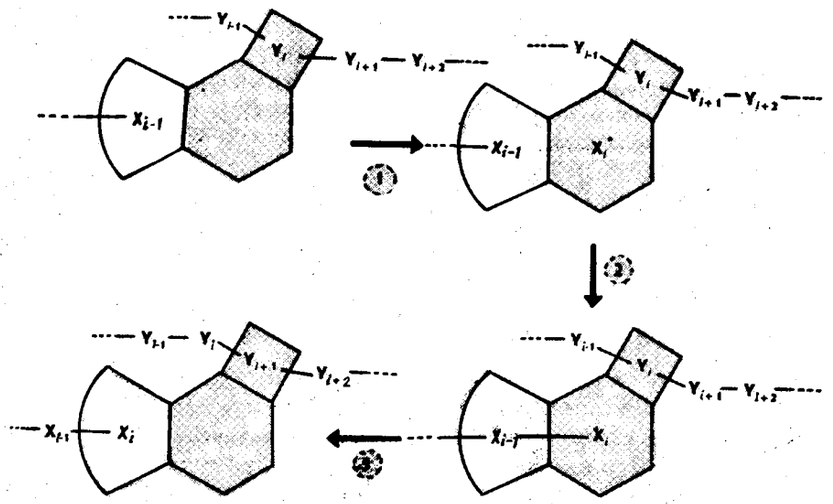


Рис. 49. Схема процессов, происходящих в активном центре матричного фермента при элонгации:

Y – кодирующие элементы матрицы; X – мономерные звенья растущей цепи; X_i^* – свободный мономер; *1* – отбор мономера; *2* – образование химической связи; *3* – транслокация

концом растущей цепи, который в результате занимает участок отбора мономера. Кроме того, при правильном протекании процесса каждый кодирующий элемент должен участвовать в одном акте роста цепи и затем уступить свою роль непосредственно следующему за ним кодирующему элементу. Поэтому после присоединения мономера в участке связывания кодирующего элемента оказывается уже прочитанный фрагмент матрицы. Иными словами, система оказывается не готовой для следующего акта элонгации. Чтобы сделать его возможным, необходимо перемещение растущей цепи с освобождением участка отбора мономера и одновременно перемещение матрицы на один кодирующий элемент. Такое перемещение матрицы и продукта называется *транслокацией*. Таким образом, каждый акт элонгации складывается из трех основных элементов: отбора мономера, химического превращения и транслокации. Фактически, по крайней мере в случае биосинтеза белков, элонгация является еще более сложным событием, требующим участия специальных белковых факторов и расходования энергии. Несколько подробнее этот вопрос рассмотрен в § 5.6.

Проведенное рассмотрение, а также множество экспериментальных данных свидетельствуют, что в ходе матричного биосинтеза происходит направленное перемещение матрицы относительно активного центра полимеразы нуклеиновых кислот или рибосомы. В этом смысле процесс считывания информации с молекул ДНК и мРНК скорее напоминает не снятие отпечатков с типографских матриц, а работу магнитофонной ленты, протягиваемой через считывающее устройство. Поэтому и говорилось, что термин матричный биосинтез и само понятие матрицы являются не вполне удачными.

Здесь сделана попытка сформулировать общие принципы матричного биосинтеза, свойственные всем системам, осуществляющим биосинтез белков и нуклеиновых кислот. Ниже рассмотрены конкретные биохимические превращения для трех главных матричных процессов и некоторые специфические особенности, присущие каждому из них.

5.4. БИОСИНТЕЗ ДНК (РЕПЛИКАЦИЯ)

Матричный синтез ДНК, катализируемый *ДНК-полимеразами*, выполняет две основные функции: репликацию ДНК, т.е. синтез новых дочерних цепей, комплементарных исходным материнским цепям, и репарацию двунитевых ДНК, имеющих бреши в одной из цепей, образовавшиеся в результате вырезания поврежденных участков этой цепи специальными нуклеазами. В обоих случаях ДНК-полимеразы катализируют перенос дезоксирибонуклеотидных фрагментов от дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатов на гидроксигруппу 3′-концевого фрагмента растущей или подлежащей регенерации цепи. Уравнение реакции с использованием сокращенной символики (см. § 2.3) можно записать в виде

$$\dots pdX_{i-1}\,pdX_i{-}OH + pppdX_{i+1}{-}OH \longrightarrow \dots pdX_{i-1}\,pdX_i\,pdX_{i+1}{-}OH + PP_i \qquad (V.2)$$

Из этого уравнения видно, что ДНК-полимеразы являются представителями класса трансфераз.

Более полная запись должна учитывать обязательное присутствие комплементарной матрицы. Обозначая произвольную пару комплементарных дезоксирибонуклеозидов как $dX_j d\bar{X}_j$, уравнение ДНК-полимеразной реакции с участием матрицы можно записать в виде

$$\begin{array}{l} (5') \quad \cdots pd\bar{X}_{i-1}\,pd\bar{X}_i{-}OH \qquad\qquad (3') \\ (3') \quad \cdots dX_{i-1}\,pdX_i\;pdX_{i+1}\,pdX_{i+2}\,p\cdots (5') \end{array} + pppd\bar{X}_{i+1}{-}OH \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \begin{array}{l} (5')\cdots pd\bar{X}_{i-1}\,pd\bar{X}_i\,pd\bar{X}_{i+1}{-}OH\cdots \qquad (3') \\ (3')\cdots dX_{i-1}\,pdX_i\,pdX_{i+1}\,pdX_{i+2}\,p\cdots (5') \end{array} \qquad (V.3)$$

Использование в качестве субстратов дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатов делает процесс образования фосфодиэфирных связей термодинамически выгодным, поскольку неблагоприятное в водном растворе образование фосфодиэфира из монофосфата и гидроксикомпонента ($\Delta G > 0$) протекает сопряженно с гидролизом ангидридной пирофосфатной связи. Необходимая энергия запасается на предыдущих нематричных стадиях фосфорилирования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, происходящего с участием соответствующих нуклеозидмонофосфат- и нуклеозиддифосфаткиназ (см. § 4.2). На этих стадиях расходуется АТФ, т. е. потребляется энергия, запасенная в пирофосфатных связях этого универсального аккумулятора энергии в биологических системах.

Как видно из уравнения (V.3), в реакции помимо фермента участвует три компонента: матрица, растущая цепь и субстрат. Наличие в системе фрагмента нуклеиновой кислоты, комплементарного матрице, является необходимым условием функционирования ДНК-полимераз. Этот фрагмент называют затравкой по аналогии с затравочным кристаллом, вносимым в насыщенный раствор при кристаллизации, или, чаще *праймером* (русифицированный вариант английского термина primer).

В клетках как прокариот, так и эукариот имеется несколько различных ДНК-

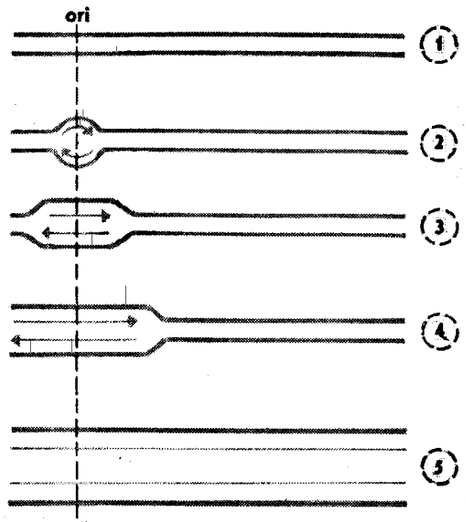


Рис. 50. Схема репликации линейной двунитевой ДНК:
1 – исходная двунитевая ДНК; *2–3* – промежуточные структуры до достижения вилкой репликации левого конца ДНК; *4* – промежуточная Y-образная форма; *5* – разошедшиеся новые двунитевые структуры. Жирной чертой изображены материнские цепи, тонкой – дочерние; стрелки обозначают направление вдоль цепи от 5′- к 3′-концу

полимераз. В частности, для *E.coli* известно три ДНК-полимеразы: I, II и III. Функции ДНК-полимеразы II мало изучены, и она не является жизненно необходимым ферментом – мутанты с дефектной ДНК-полимеразой II жизнеспособны и могут размножаться. ДНК-полимераза I является первым открытым матричным ферментом (А.Корнберг, 1956) и к настоящему времени изучена наиболее полно. Она представляет собой белок, построенный из одной полипептидной цепи, имеет молекулярную массу свыше 100 кДа и является ферментом репарации. По-видимому, она участвует также в некоторых заключительных стадиях репликации. ДНК-полимераза III состоит из семи субъединиц, в сумме составляющих около 380 кДа, причем собственно ДНК-полимеразной активностью обладает ее самая большая субъединица с молекулярной массой около 140 кДа. Она является ферментом репликации. Если ДНК-полимеразы I в клетке присутствует несколько сотен копий, то реплицирующей ДНК-полимеразы III содержится 10 - 20 копий. В то же время в реакции элонгации она работает со скоростью, превышающей в 15 раз скорость работы ДНК-полимеразы I.

У эукариот достоверно установлено наличие не менее трех ДНК-полимераз. В репликации ДНК хромосом участвует ДНК-полимераза α, в репарации – скорее всего ДНК-полимераза β, ДНК-полимераза γ является ферментом, осуществляющим репликацию ДНК митохондрий.

Репликация двунитевой ДНК в клетках является сложным, далеко не во всех деталях исследованным процессом. Реакция (V.3) является не единственным химическим событием, происходящим в ходе репликации. Ниже рассмотрены другие наиболее достоверно установленные и имеющие общее значение химические превращения, необходимые для полного удвоения материнских молекул ДНК.

Репликация не начинается, как правило, с концов линейных двунитевых молекул. Это тем более верно для кольцевых молекул, у которых такие концы просто отсутствуют. В классическом варианте репликация начинается в строго определенных участках, получивших название участков ori (сокращение от термина origin of replication), и от этого участка распространяется в обе стороны. Поскольку двунитевые ДНК хорошо видны под электронным микроскопом, то возможно визуальное наблюдение процессов как для линейной ДНК (рис. 50) на примере ДНК бактериофага T7, так и для кольцевой ДНК (рис. 51) на примере плазмидной ДНК и вирусной ДНК обезьяньего вируса 40 (SV40). В случае линейной ДНК первоначально образуется фигура, имеющая форму глаза. Затем, когда репликация одной из нитей достигнет конца молекулы, структура принимает Y-образную форму. При репликации кольцевой двунитевой ДНК промежуточная структура называется θ-образной в соответствии с тем, как она выглядит в середине цикла репликации. В обоих случаях в обе стороны от участка ori перемещаются области, в которых непосредственно проходит репликация и которым предшествуют точки разветвления материнских цепей ДНК. Участок, примыкающий к точке разветвления, называют репликационной вилкой. Ниже рассматриваются процессы, происходящие в ***вилке репликации***, перемещающейся влево от наблюдателя. События, предшествующие началу репликации в участке ori, сложны и до конца не изучены, поэтому они рассматриваться в этом курсе не будут.

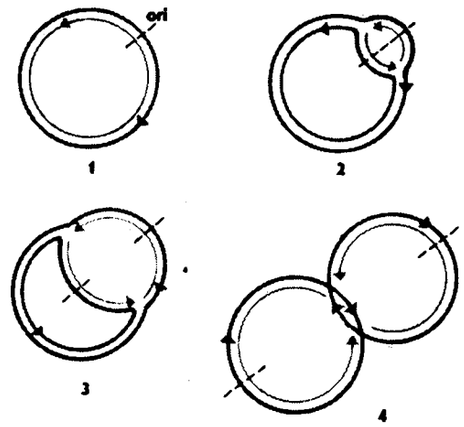


Рис. 51. Схема репликации кольцевой двунитевой ДНК (обозначения те же, что на рис. 50):
1 – исходная кольцевая ДНК; *2* – начальная фаза репликации; *3* – средняя фаза репликации; *4* – структура незадолго до конца репликации и расхождения новых двунитевых структур

Для того чтобы новые участки материнских нитей становились доступными репликации, должно происходить разделение нитей. Это достигается с помощью специальных ферментов — ***геликаз***, которые перемещаются в рассматриваемом случае влево вдоль обеих цепей материнской ДНК, раскручивая их. Такое направленное перемещение ферментов требует затраты энергии, и каждый акт перемещения обеих геликаз сопровождается гидролизом пирофосфатной связи в молекулах АТФ. Таким образом, геликазы обладают АТФазной активностью. Геликазы неидентичны, поскольку им приходится двигаться в различных физических направлениях двух полинуклеотидных цепей. В ходе продвижения вилки репликации в определенном направлении, в рассматриваемом случае влево, вилка, а следовательно, и геликазы, в силу антипараллельной ориентации комплементарных материнских цепей, по отношению к одной из них движутся от 3′- к 5′-концу, а по отношению к другой от 5′- к 3′-концу. В случае *E.coli* первая получила название геликазы α или Rep-белка, вторая — геликазы II.

В отличие от геликаз ДНК-полимеразы в соответствии с приведенной схемой (V.3) катализируемой ими реакции могут перемещаться только от 3′- к 5′-концу матрицы. Поэтому непрерывное продолжение элонгации растущей цепи по мере раскручивания двунитевой материнской ДНК может идти только вдоль одной цепи-матрицы, той, относительно которой вилка репликации движется от 3′- к 5′- концу. Непрерывно синтезируемая цепь получила название ведущей (рис. 52). Чтобы начался синтез на второй материнской цепи-матрице, необходима инициация синтеза новой цепи. Эта цепь получила название запаздывающей. Однако,

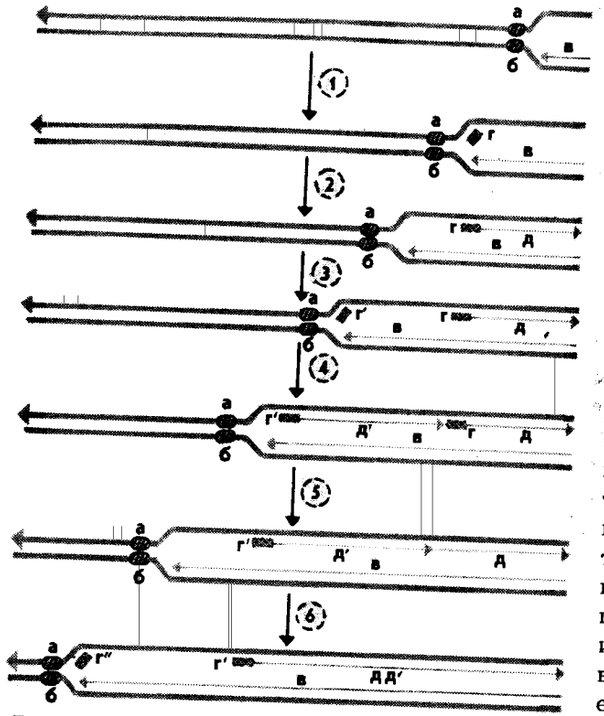


Рис. 52. Схема процессов, происходящих по мере продвижения вилки репликации влево:

а – геликаза II; *б* – геликаза α (Rep-белок); *в* – ведущая дочерняя цепь ДНК; *г*, *г′*, *г″* – рибонуклеотидные праймеры; *д*, *д′*, *дд′* – запаздывающая дочерняя цепь; *1* – образование праймера на матрице запаздывающей цепи; *2* – синтез запаздывающей цепи; *3* – образование нового праймера; *4* – синтез нового фрагмента запаздывающей цепи до стыковки с предыдущим фрагментом; *5* – удаление первого рибонуклеотидного праймера и застройка бреши дезоксирибонуклеотидным фрагментом; *6* – соединение двух фрагментов запаздывающей цепи ДНК-лигазой и образование следующего праймера. По ходу всех процессов *1–6* идет элонгация ведущей дочерней цепи

как уже указывалось, для ДНК-полимеразы необходимо наличие связанного с матрицей праймера. Такой праймер создается с помощью специального фермента *праймазы*, катализирующего синтез короткого, комплементарного определенному участку матрицы рибоолигонуклеотида. Фрагменты, на которых может происходить синтез такого праймера, разбросаны вдоль цепи ДНК с интервалами в среднем в несколько десятков нуклеотидов. После образования праймера включается в работу ДНК-полимераза и начинается синтез запаздывающей нити. Однако он происходит в направлении от вилки репликации, и по мере ее продвижения вновь возникает нереплицированный однонитевый участок материнской цепи — матрицы запаздывающей нити. Лишь после того как перемещение вилки репликации освободит следующий участок, имеющей сродство к праймазе, на ней возникнет новый праймер и начнется синтез нового фрагмента запаздывающей цепи. Таким образом, эта цепь в отличие от ведущей синтезируется в виде фрагментов. Наличие таких фрагментов вновь синтезированной ДНК удалось обнаружить экспериментально. По имени открывшего их японского исследователя они получили название *фрагментов Оказаки*. Как видно из рис. 52, стадия 4, второй фрагмент Оказаки через некоторое время достигнет 5′-конца предыдущего фрагмента, который представлен несколькими рибонуклеотидными звеньями. В конечном продукте эти звенья присутствовать не должны. Для удаления таких звеньев в клетках существует по меньшей мере два механизма.

Один из механизмов связан с наличием у ДНК-полимераз (это, во всяком случае, надежно установлено для ДНК-полимераз из *E. coli*) дополнительной экзонуклеазной активности, способной катализировать гидролитическое отщепление 5′-концевого рибо- или дезоксирибонуклеотидного фрагмента, оказавшегося на матрице на пути перемещения ДНК-полимеразы. В результате этой *5′ ⟶ 3′-экзонуклеазной активности* 5′-концевые фрагменты бывшего праймера удаляются, т. е. ДНК-полимераза в своем стремлении расчистить путь для продвижения вперед убирает рибоолигонуклеотидные фрагменты. Одновременно с этим за счет своей основной активности она застраивает возникающую брешь дезоксирибонуклеотидными остатками. Второй механизм удаления рибоолигонуклеотидных фрагментов основан на присутствии в клетках особой рибонуклеазы, получившей название *РНКазы H*. Этот фермент специфичен к двунитевым структурам, построенным из одной рибоолигонуклеотидной и одной дезоксирибонуклеотидной цепи, причем гидролитически расщепляет первую из них. РНКаза H также способна удалять остатки рибоолигонуклеотидного праймера с последующей застройкой бреши с помощью ДНК-полимеразы.

В итоге фрагменты Оказаки превращаются в цепи, построенные только из дезоксирибонуклеотидов. Однако на стыке двух фрагментов остаются 5′-концевой фосфомоноэфирный фрагмент первого и 3′-гидроксигруппа второго фрагмента. Их соединение в единую цепь происходит при помощи еще одного фермента, являющегося обязательным участником репликации, — *ДНК-лигазы*. Этот фермент катализирует соединение двух фрагментов по реакции, аналогичной описанной в § 4.6 для РНК-лигазы, используя для образования промежуточного смешанного ангидрида с АМФ, который переносится либо от АТФ, либо от NAD^+. В последнем случае на первой стадии реакции освобождается не пирофосфат, а никотинамидмононуклеотид. Процесс проходит только в составе двунитевой структуры. Схема процесса может быть представлена в виде

$$\cdots pd\bar{X}_{i-1}\,pd\bar{X}_i\text{–OH}\;\; pd\bar{X}_{i+1}\,pd\bar{X}_{i+2}pd\bar{X}_{i+3}\cdots \;\; + YpA \longrightarrow$$
$$\cdots\cdot dX_{i-1}\,pdX_i \qquad X_{i+1}\,pdX_{i+2}pdX_{i+3}\,p\cdots$$

$$\longrightarrow \begin{array}{l} \cdots pd\bar{X}_{i-1}\,pd\bar{X}_i\text{–OH}\;\; \overset{pA}{pd\bar{X}_{i+1}}pd\bar{X}_{i+2}pd\bar{X}_{i+3}\cdots \\ \cdots\cdot dX_{i-1}\,pdX_i \qquad X_{i+1}pdX_{i+2}pdX_{i+3}p\cdots \end{array} + Y \longrightarrow \qquad (V.4)$$

$$\longrightarrow \begin{array}{l} \cdots pd\bar{X}_{i-1}\,pd\bar{X}_i\;pd\bar{X}_{i+1}\,pd\bar{X}_{i+2}\,pd\bar{X}_{i+3}\cdots \\ \cdots\cdot dX_{i-1}\,pdX_i\;pdX_{i+1}\,pdX_{i+2}\,pdX_{i+3}p\cdots \end{array} + pA\;\;(АМФ)$$

где Y — пирофосфат или никотинамидмононуклеотид.

Развертывание двунитевой спиральной структуры геликазами не создает каких-либо осложнений, если, как это представлено на рис. 50, концы ДНК свободны. Если же они закреплены, как это, бесспорно, имеет место в кольцевых ДНК и скорее всего у ДНК в хромосомах эукариот, то раскручивание двойной спирали создает в остальной части структуры сверхспирализацию. При этом, поскольку раскручивается правая спираль, возникает и постепенно усиливается положительная сверхспирализация. Это не может не сказываться на протекании процессов в вилке репликации и должно постепенно привести к торможению процесса в целом. Чтобы избежать этого, необходимо введение в сохранившуюся двуспиральную структуру отрицательных супервитков. Этот процесс осуществляется с помощью еще одного специального фермента, играющего важную роль в процессе репликации, — *ДНК-топоизомеразы II*. Название связано с тем, что единственной функцией этого фермента является введение в двунитевую ДНК отрицатель-

ных супервитков, т. е. катализ взаимопревращений топологических изомеров ДНК. Это не означает, что действие фермента не сопровождается никакими химическими превращениями. Во-первых, топоизомераза II требует для своей работы затраты энергии, а создание супервитков сопровождается гидролизом АТФ, т.е. фермент является АТФазой. Во-вторых, детальный механизм ее действия включает введение разрыва в одну из полинуклеотидных цепей и воссоединение разорванных фрагментов после их перемещения относительно второй цепи, приводящего к возникновению супервитка.

Таким образом, в репликации ДНК помимо ДНК-полимеразы принимает участие большой набор ферментов: геликаза, праймаза, РНКаза H, ДНК-лигаза и топоизомераза II. Этим список ферментов и тем более белков вообще, существенных для матричного биосинтеза ДНК, не исчерпывается. Полная картина еще не выяснена. В качестве еще одного достаточно хорошо изученного белка, необходимого для полноценного функционирования системы ферментов, работающих в вилке репликации, можно привести белок, специфично и кооперативно связывающийся с однонитевыми ДНК. Его чаще всего называют *белком SSB* (single strand binding). В первых работах он фигурировал как ДНК-раскручивающий белок. Белок SSB вследствие сродства к однонитевой ДНК и способности, будучи связанным с полинуклеотидной цепью, интенсивно взаимодействовать с соседними молекулами белка закрывает возникающие при действии геликаз однонитевые участки матрицы, препятствуя их обратной рекомбинации до прихода в эти точки ДНК-полимеразы.

Во всех процессах матричного биосинтеза имеется хотя и малая, но конечная вероятность ошибки системы при отборе мономера и тем самым включения в растущую цепь биополимера мономерного фрагмента, не соответствующего кодирующему его элементу матрицы. Такие ошибки особенно нежелательны в случае репликации, так как если ошибочно включенный в дочернюю цепь нуклеотид сохранится до следующего цикла репликации, искаженная информация будет передана следующему поколению и практически необратимо унаследована. Сам по себе отбор матрицей дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов требуемой точности не обеспечивает, и система репликации требует наличия дополнительного корректирующего механизма. Эту роль выполняет присущая ДНК-полимеразам *3′⟶ 5′-экзонуклеазная активность*, катализирующая гидролитическое отщепление 3′-концевого звена растущей цепи в ее комплексе с матрицей. Скорость гидролиза особенно велика в случае, если включенный в растущую цепь остаток не комплементарен кодирующему нуклеотиду матрицы. При этом скорость основной ДНК-полимеразной реакции и 3′⟶ 5′-экзонуклеазного гидролиза сбалансированы таким образом, что если в присутствии достаточных концентраций всех четырех субстратов присоединится нуклеотид, комплементарный соответствующему звену матрицы, то резкое преимущество перед гидролизом будет иметь присоединение следующего звена цепи. Если присоединится ошибочный, некомплементарный нуклеотид, то вероятность гидролиза существенно превысит вероятность следующего акта элонгации. В результате не комплементарный кодирующему элементу матрицы остаток нуклеотида имеет не только резко пониженную по сравнению с комплементарным вероятность быть встроенным в растущую цепь, но и резко повышенную вероятность быть удаленным в результате действия 3′⟶ 5′-экзонуклеазной активности до того, как сможет пройти следующий акт элонгации.

5.5. БИОСИНТЕЗ РНК (ТРАНСКРИПЦИЯ)

Матричный биосинтез РНК осуществляется с помощью ферментов, называемых РНК-полимеразами или, более развернуто, ДНК-зависимыми РНК-полимеразами. Эти ферменты катализируют реакцию, совершенно аналогичную реакции (V.2), катализируемой ДНК-полимеразами, с той лишь разницей, что ее участниками являются четыре рибонуклеозид-5′-трифосфата, три из которых содержат те же гетероциклы, что и субстраты синтеза ДНК, а один — уридин-5′-трифосфат, выступающий в качестве рибоаналога дезокситимидин-5′-трифосфата, используемого в процессах репарации и репликации, вместо тимина содержит урацил:

$$\ldots pX_{i-1}\ pX_i - OH + pppX_{i+1} - OH + \ldots pX_{i-1}\ pX_i\ pX_{i+1} - OH + PP_i \qquad (V.5)$$

В соответствии с этим уравнением РНК-полимеразы, как и ДНК -полимеразы, относятся к классу трансфераз и являются нуклеотидилтрансферазами. Сопровождающий присоединение каждого нуклеотидного остатка к растущей цепи разрыв пирофосфатной связи в субстрате обеспечивает отрицательное значение ΔG в процессе поликонденсации.

Матрицей при транскрипции служит двунитевая ДНК. Имеется много экспериментальных данных, свидетельствующих, что вблизи активного центра РНК-полимераз происходит локальное расплетение двунитевой структуры, и одна из освободившихся нитей принимает участие в отборе комплементарных субстратов в каждом акте роста полинуклеотидной цепи. Однако по мере продвижения фермента относительно матрицы прочитанная цепь, которую называют транскрибируемой, вновь объединяется с нетранскрибируемой нитью, и прошедшая через контакт с ферментом ДНК остается двунитевой. РНК-Продукт, который часто называют транскриптом, получается в виде однонитевой структуры. (рис. 53). Последовательность нуклеотидов транскрипта аналогична последовательности соответствующих остатков в нетранскрибируемой цепи, с той лишь разницей, что во всех звеньях транскрипта присутствуют остатки рибозы вместо остатков дезоксирибозы у матрицы и в местах, где звенья матрицы содержат тимин, звенья транскрипта содержат урацил.

Из прокариотических РНК-полимераз наиболее изучен фермент из *E.coli*. Он содержит основное ядро — кор (от анг. core — сердцевина), — содержащее три различных субъединицы — α, β и β', причем α-субъединица представлена двумя копиями, так что фермент имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta\beta'$. В таком виде фермент катализирует процесс элонгации. Для того чтобы инициация биосинтеза РНК прошла в должном месте, необходимо участие дополнительного полипептида, который часто рассматривают как компонент полного фермента (голофермента) РНК-полимеразы и обозначают буквой σ. После нескольких шагов элонгации σ-субъединица выходит из комплекса фермента с матрицей и продуктом.

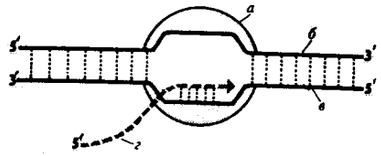


Рис. 53. Схема взаимодействия цепей матрицы и продукта при транскрипции:

а – РНК-полимераза; *б* – нетранскрибируемая нить ДНК; *в* – транскрибируемая нить ДНК; *г* – РНК-продукт (транскрипт). Участки цепи. образующие спиральные двунитевые структуры, соединены вертикальными линиями

У эукариот имеются три основные РНК-полимеразы, обозначаемые либо римскими цифрами, либо заглавными буквами латинского алфавита. РНК-Полиме-

раза I (A) катализирует синтез предшественников больших рибосомных РНК, т.е. транскрипцию генов этих РНК. РНК-Полимераза II (B) осуществляет транскрипцию всех генов информационных РНК. РНК-Полимераза III (C) участвует в транскрипции 5S РНК, транспортных РНК и некоторых других небольших РНК со специальными функциями. Все эти ферменты устроены достаточно сложно и содержат каждый около десяти различных субъединиц.

Многосубъединичная структура, свойственная прокариотическим и в еще большей мере эукариотическим РНК-полимеразам, не является обязательным условием для осуществления процесса транскрипции. Известны эффективно работающие РНК-полимеразы, состоящие из одной субъединицы. Такие РНК-полимеразы образуются в клетках бактерий, инфицированных некоторыми вирусами. Из них наиболее изучена РНК-полимераза бактериофага T7, которая возникает в клетках *E.coli*, зараженных фагом, и программа, для синтеза которой содержится в ДНК фага T7.

В отличие от ДНК-полимераз РНК-полимеразы способны осуществлять реакцию инициации, уравнение которой в сокращенной символике записывается в виде

$$pppX_1 - OH + pppX_2 - OH \longrightarrow pppX_1pX_2 - OH + PP_i \qquad (V.6)$$

При этом первый нуклеотид в подавляющем большинстве изученных случаев является пуриновым. Из приведенного уравнения реакции инициации следует, что на 5′-конце продукта инициации содержится трифосфатная группа. Эта группа сохраняется в транскрипте до тех пор, пока в результате последующего процессинга не будет отщеплен с 5′-конца содержащий эту группу олигонуклеотид.

Инициация проходит на строго определенном участке матрицы. Это происходит в результате высокоселективного взаимодействия РНК-полимеразы со специальным участком матрицы, называемым *промотором*. В большом числе случаев промотор расположен вне пределов области, программирующей синтез РНК, в сторону, противоположную направлению перемещения РНК-полимеразы (в английском языке такое направление обозначается как «вверх по течению» — upstream, а направление, в котором перемещается фермент, соответственно «вниз по течению» — downstream). В районе промотора нуклеотидным парам матрицы, содержащим кодирующие элементы, присваиваются соответствующие номера от +1 и выше. Нуклеотидные пары, расположенные «вниз по течению», получают номера от +1 и выше, парам, расположенным «вверх по течению» от +1-й пары, присваиваются отрицательные значения начиная с номера −1.

Наиболее детально изученные промоторы РНК-полимеразы *E. coli* содержат два гексануклеотидных фрагмента в районе −10 и −35, которые особенно существенны для связывания с РНК-полимеразой.

Хотя и та, и другая последовательности для разных промоторов далеко не идентичны, но все они достаточно близки к некоторой последовательности, которую принято называть консенсусом, причем, как правило, чем ближе структура промотора к консенсусу, тем эффективнее работает промотор.Ниже приводится структура *консенсуса*, характерная для большинства генов, транскрибируемых РНК-полимеразой из *E. coli*. Для сравнения приведена структура аналогичного участка промотора для гена, программирующего синтез транспортной РНК, специфичной к тирозину ($tRNA^{Tyr}$) (для него приводится лишь структура верхней, нетранскрибируемой нити):

(5′) .... pdTpdApdTpdApdApdT .... (3′)
(3′) .... dApdTpdApdTpdTpdAp .... (5′)
} консенсус (участок − 12 ÷ − 7)

(5′) .... pdTpdApdTpdGpdApdT .... (3′) ген $tRNa^{tyr}$ (участок − 13 ÷ − 8)

(5′) .... pdTpdTpdGpdApdCpdA.... (3′)
(3′) .... dApdApdCpdTpdGpdTp ... (5′)
} консенсус (участок − 36÷ − 31)

(5′) .... pdTpdTpdTpdApdCpdA.... (3′) ген $tRNA^{tyr}$ (участок − 35 ÷ −30)

В данном случае промотор гена $tRNA^{Tyr}$ отличается от консенсуса в обоих районах на один нуклеотид и несколько смещен относительно положения обоих консенсусов. Важной чертой участков, расположенных в районе пары — 10, является преобладание пар A·T, существенно менее прочных, чем пары G·C. Это облегчает необходимое для процесса инициации расхождение цепей матрицы в районе промотора и начала транскрипции.

Выбор промотора, как уже отмечалось, в решающей степени определяется σ-субъединицей РНК-полимеразы. При существенном повышении температуры среды *E. coli* начинает вырабатывать новый тип субъединицы, в результате чего РНК-полимераза направляется на промоторы, управляющие синтезом мРНК, программирующих синтез специальных защитных белков, называемых белками теплового шока. Этот прием используют некоторые бактериофаги. Например, бактериофаг T4 имеет в составе своей ДНК программы для синтеза двух белков, которые связываются с ядром РНК-полимеразы *E. coli* и направляют ее на промоторы, расположенные на фаговой ДНК, переключая деятельность клетки на производство мРНК и белков бактериофага.

РНК-Полимеразы из других источников также могут узнавать свои характерные промоторы. Например, упоминавшаяся в начале параграфа РНК-полимераза фага T7 специфично взаимодействует с промотором, простирающимся от −17-й до +6-й пары нуклеотидов. Консенсусная последовательность имеет вид (в целях краткости и большей наглядности префикс d и символ p для межнуклеотидных фосфатов опущены. Снизу в той же записи представлен консенсус для района −12 ÷ −7 для бактериальной полимеразы)

(5′) TAATACGACTCACTATAGGGAGA (3′) участок −17 ÷ +6
(3′) ATTATGCTGAGTGATATCCCTCT (5′)

(5′) TATAAT (3′) участок −12 ÷ −7
(3′) ATATTA (5′)

Видно, что промотор фаговой РНК-полимеразы не имеет никаких черт сходства с промотором РНК-полимеразы хозяина.

Терминация биосинтеза РНК изучена существенно меньше, чем инициация, и в основном только для фермента из *E. coli*. Она обусловлена специфической структурой участка транскрипта, непосредственно предшествующего району терминации, и, по-видимому, происходит в результате ослабления связи транск-

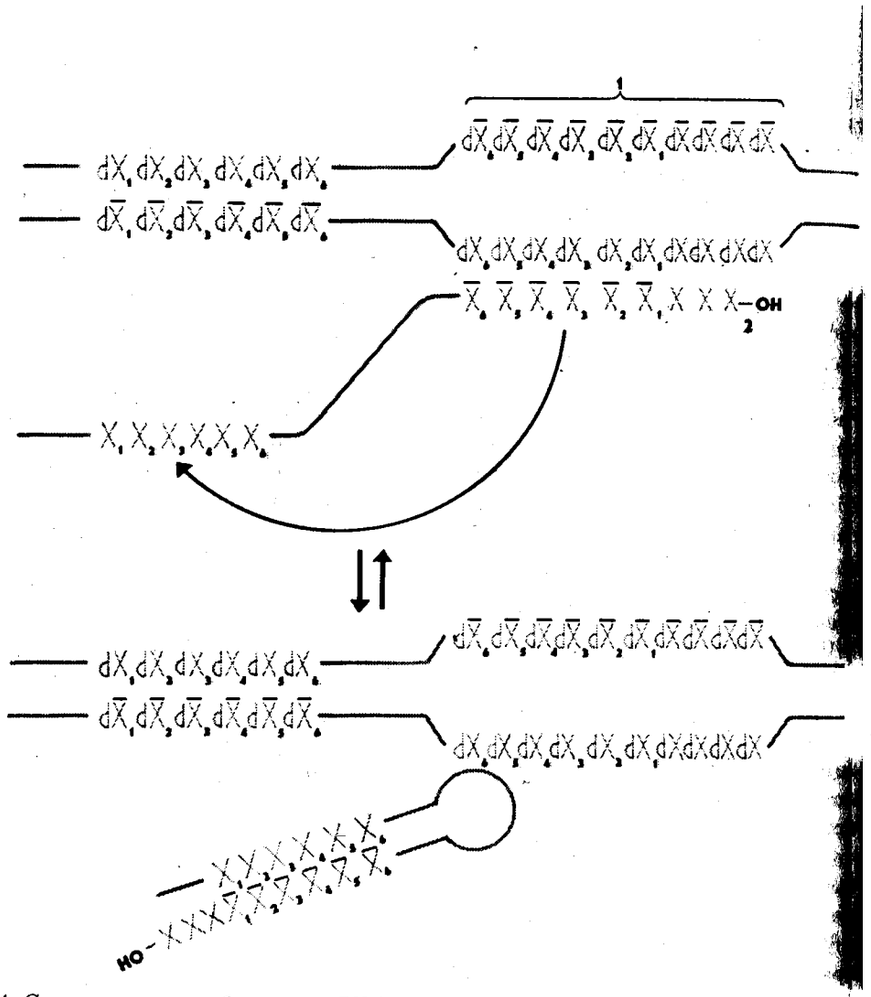


Рис. 54. Схема терминации биосинтеза РНК:

1 – участок комплекса транскрипта фермент–матрица; *2* – 3′-конец транскрипта; X и $\bar{X}$ – произвольные пары комплементарных нуклеотидов

рипта с комплексом фермент — матрица. Главной особенностью этого участка является способность к образованию прочной шпилечной структуры (см. § 3.4). Можно представить себе, что расположенная «вверх по течению» часть транскрипта, образующая одну из частей стебля этой шпилечной структуры, вытаскивает образовавшуюся позднее вторую, комплементарную ей часть стебля из комплекса с транскрибируемой цепью и тем самым уводит 3′-конец транскрипта из каталитического центра фермента и делает невозможной последующую элонгацию (рис. 54). Однако для такого вытаскивания нужен некоторый дополнительный благоприятствующий ему фактор. В некоторых случаях эту функцию выполняет специальный блок, известный под названием фактора ρ. В других участках, где происходит независимая от ρ терминация, к шпилечной структуре с 3′-конца транскрипта непосредственно примыкает несколько остатков уридиловой кислоты. Поскольку пары A·U много слабее пар G·C, их связь с транскрибируемой цепью не может удержать транскрипт от перехода в шпилечную структуру, в стебле которой, как правило, имеется много пар G·C.

Как уже отмечалось в § 5.1, РНК чаще всего образуется в виде предшественников и затем уже без участия матричных систем перерабатывается в зрелые молекулы. Всю совокупность происходящих при этом превращений для РНК, равно как и для белков (см. § 5.3), называют *процессингом*. Он осуществляется большим набором ферментов, и в рамках настоящего курса можно лишь вкратце изложить основные типы происходящих процессов.

Во-первых, в ряде случаев РНК образуется в виде предшественников, содержащих несколько будущих молекул РНК в составе одной полинуклеотидной цепи. Например, рибосомные РНК (см. § 3.8) прокариот образуются в виде предшественника, содержащего 16S, 23S, 5S РНК, а иногда еще и некоторые транспортные РНК. Аналогично, рибосомные РНК эукариот первоначально получаются в виде предшественника, содержащего 18S, 28S и 5,8S РНК. Иногда несколько транспортных РНК образуются в виде единого предшественника. Во всех случаях между будущими зрелыми молекулами находятся фрагменты, которые ни в одну из конечных структур не войдут. Поэтому на первой стадии процессинга необходимо нарезание предшественника на фрагменты, каждый из которых содержит лишь одну из целевых молекул РНК.

Во-вторых, образующиеся при этом новые предшественники содержат с одного или обоих концов лишние олигонуклеотидные фрагменты. Поэтому необходимо подравнивать концы молекул с помощью специальных ферментов до нормального размера. Интересно отметить, что для прокариотических РНК подравнивание тРНК с 5′-концов происходит с помощью единого фермента — РНКазы P, которая содержит в своем составе не только белок, но и молекулу РНК, скорее всего участвующую в узнавании субстрата, каковым является предшественник.

В-третьих, как уже говорилось в § 5.1, многие первичные транскрипты РНК эукариот содержат крупные вставочные последовательности — интроны. Их вырезание с воссоединением концов соседних экзонов в единую цепь является важным этапом созревания эукариотических РНК.

Наконец, многие РНК, в первую очередь тРНК, подвергаются многочисленным химическим модификациям, приводящим к образованию в составе зрелой молекулы широкого спектра так называемых минорных компонентов. Некоторые примеры приведены в § 2.3. В этих превращениях участвуют различные специализированные ферменты, причем не все из них достаточно охарактеризованы. Наиболее обстоятельно исследованы ферменты, катализирующие различные реакции метилирования. Каждый из них катализирует перенос метильной группы от S-аденозилметионина на определенный атом гетероцикла или 2′-гидроксигруппу остатка рибозы, причем модификации подвергаются не все однотипные участки, а лишь некоторые, вполне определенные. Как видно из структуры дрожжевой тРНК, специфичной к фенилаланину, (см. рис. 28), 5-метильная группа присутствует в остатках цитозина, находящихся в положениях 40 и 49, а все остальные цитозины неметилированы. Это означает, что соответствующий фермент — *тРНК (цитозин-5)-метилтрансфераза* — специфично направляет метильную группу именно на эти остатки тРНК, т. е. обладает специфичностью как к определенному положению в гетероцикле, так и к определенным положениям в молекуле тРНК. В превращениях остатков гуанозина в положении 10 в N2-метил-

гуанозин, в положении 34 в антикодоне в 2′-О-метилгуанозин и в положении 46 в N7-метилгуанозин участвуют разные ферменты, соответственно *тРНК (гуанин-2)-метилтрансфераза*, *тРНК (гуанозин-2′)-метилтрансфераза* и *тРНК (гуанин-7)-метилтрансфераза*. Транскрипция является точкой приложения действия ряда биологически активных веществ, в том числе антибиотиков и токсинов. Например, как уже указывалось в § 2.5, антибиотик рифампицин специфично блокирует действие прокариотических РНК-полимераз, связываясь с β-субъединицей и препятствуя этим образованию первых фосфодиэфирных связей. Токсин бледной поганки α-аманитин (см. § 2.5) блокирует РНК-полимеразу II эукариот, в результате чего прекращается синтез новых молекул мРНК и, вслед за этим, производство многих жизненно важных белков.

5.6. БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ (ТРАНСЛЯЦИЯ)

Реакция образования новых пептидных связей на рибосомах на стадии элонгации представляет собой перенос растущей пептидной цепи длиной i звеньев, связанной сложноэфирной связью с одной из гидроксигрупп 3′-концевого нуклеотида тРНК, специфичной к i-й аминокислоте, на α-аминогруппу $(i+1)$-й аминокислоты, связанной со специфичной к ней тРНК

$$NH_3^+CHR_1CO...NHCHR_iCO{-}O{-}tRNA^{(i)} + NH_3^+CHR_{i+1}CO{-}O{-}tRNA^{(i+1)} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow NH_3^+CHR_1CO...NHCHR_iCO{-}NHCHR_{i+1}CO{-}O{-}tRNA^{(i+1)} + HO{-}tRNA^{(i)} \qquad (V.7)$$

Следовательно, полипептидная цепь при биосинтезе белков растет в направлении от N-конца к С-концу, а фермент, вмонтированный в рибосому и катализирующий это химическое превращение, является *пептидил трансферазой*. Образование полипептидов из аминоацил-тРНК представляет собой превращение сложных эфиров в амиды, которое термодинамически разрешено, т. е. для этого процесса $\Delta G < 0$. Энергия Гиббса, необходимая для превращения аминокислот в пептиды, сообщается аминокислоте вне рибосомы на стадии аминоацилирования тРНК, сопряженного с гидролизом АТФ до АМФ и пирофосфата и катализируемого соответствующими аминоацил-тРНК-синтетазами (см. § 4.6).

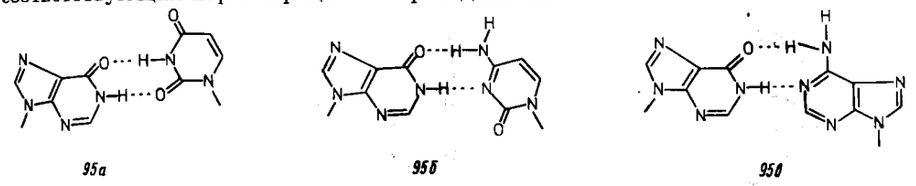
Отбор аминокислоты, соответствующей кодону, осуществляется в результате взаимодействия кодона мРНК с антикодоном тРНК — тринуклеотидным фрагментом, расположенным в антикодоновой петле тРНК (см. § 3.4 и рис. 28 и 29). Сам аминоацильный остаток в этом отборе не участвует. Уже в первые годы после открытия транспортных РНК было показано, что превращение остатка цистеина, связанного со специфичной к нему тРНК, $tRNA^{Cys}$, в аланин путем обработки никелем Ренея:

$$NH_3^+CH(CH_2SH)CO{-}O{-}tRNA^{Cys}(Cys{-}tRNA^{Cys}) + Ni \longrightarrow$$
$$\longrightarrow NH_3^+CH(CH_3)\,CO{-}O{-}tRNA^{Cys}(Ala{-}tRNA^{Cys}) + NiS \qquad (V.8)$$

приводит к тому, что в участки растущей на рибосомах полипептидной цепи, которые соответствуют кодонам цистеина, встраивается аланин. Поэтому надежность трансляции в огромной степени определяется надежностью работы аминоацил-тРНК-синтетаз, так как именно они опознают одновременно и одну определенную аминокислоту, и одну или несколько соответствующих этой аминокислоте транспортных РНК и катализируют их соединение и таким путем снабжают

аминоацильный остаток структурным элементом, необходимым для ее отбора информационной РНК, — антикодоном.

В простейших случаях взаимодействие кодона с антикодоном происходит путем образования трех канонических пар гетероциклов. Например, специфичные к метионину тРНК имеют антикодон CpApU, комплементарный метиониновому кодону ApUpG (AUG, см. табл. 5.1). Антикодон, специфичный к фенилаланину, имеет структуру GmpApA (символ m справа от G означает метилирование 2′-оксигруппы), комплементарную фенилаланиновому кодону UpUpC. Однако в большом числе случаев соответствие между третьим нуклеотидом кодона и первым нуклеотидом антикодона имеет более сложный характер. Например, одна и та же фенилаланиновая тРНК опознается обоими кодонами — и полностью комплементарным UpUpC и не полностью комплементарным UpUpU. Некоторые тРНК, специфичные к аминокислотам, кодируемым тремя и более кодонами, содержат в первом положении антикодона инозин. Такие тРНК могут взаимодействовать сразу с тремя кодонами, имеющими в третьем положении уридин, цитидин или аденозин. Например, специфичная к валину тРНК из дрожжей имеет антикодон IpApC (I — инозин) и взаимодействует с кодонами GpUpU, GpUpC и GpUpA. Структуры соответствующих пар гетероциклов приведены ниже:



95а *95б* *95в*

Возможность отклонения от канонической структуры связана с тем, что эти взаимодействия происходят на конце двуспирального фрагмента. Поэтому возможно некоторое увеличение расстояния между гликозидными атомами C_1' взаимодействующих гетероциклов, как это имеет место при образовании пары I·A (95 в), или некоторый разворот гетероцикла, как это имеет место в паре I·U (95 а). В английском языке такое отклонение от канонической структуры пар гетероциклов называют словом wobble — качание. Поэтому саму концепцию кодон-антикодовых взаимодействий, учитывающую указанные отклонения, иногда называют вобблгипотезой. В результате таких взаимодействий некоторые тРНК опознаются не одним, а несколькими кодонами, поэтому число тРНК, необходимых для трансляции, существенно меньше, чем число кодонов. В то же время оно больше, чем число аминокислот. Например, для опознавания валинового кодона GpUpG необходима специальная тРНК, имеющая антикодон CpApC. Разные тРНК, присоединяющие (акцептирующие) одну и ту же аминокислоту, называют *изоакцепторными*. Как правило, все изоакцепторные тРНК аминоацилируются с помощью одной аминоацил-тРНК-синтетазы.

Инициация синтеза полипептидной цепи представляет собой реакцию между двумя аминоацил-тРНК, несущими остатки, соответствующие первой и второй аминокислоте создаваемого белка. При этом первой аминокислотой, как правило, является метионин. В тех преобладающих случаях, когда N-концевая аминокислота зрелого белка отличается от метионина, последний удаляется в ходе процессинга синтезируемого полипептида. При этом в стадии инициации участвует специальная метиониновая тРНК, которая называется инициаторной и обозна-

чается $tRNA_i^{Met}$. Наряду с ней у всех живых организмов существует другая специфичная к метионину тРНК, элонгаторная $tRNA_e^{Met}$. У прокариот метионин, связанный с инициаторной тРНК, формилируется по α-аминогруппе по реакции

$$Met - tRNA_i^{Met} + N10 - CHO - THF \longrightarrow CHO - Met - tRNA_i^{Met} + THF \qquad (V.9)$$

катализируемой *метионил-тРНК формилтрансферазой* (THF–тетрагидрофолат, см. § 4.2). Реакцию инициации синтеза полипептидной цепи можно записать в виде:

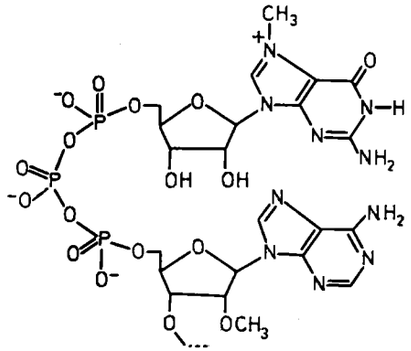
$$Z-\underset{\displaystyle CH_2CH_2SCH_3}{\overset{|}{C}}HCO-O-tRNA_i^{Met} + NH_3^+CHR_2CO-O-tRNA^{(2)} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow Z-\underset{\displaystyle CH_2CH_2SCH_3}{\overset{|}{C}}HCO-NHCHR_2CO-O-tRNA^{(2)} + tRNA_i^{Met}$$

($Z = NH_3^+-$ или CHO—NH—).

Терминация, как уже говорилось в § 5.2, происходит на специальных кодонах-терминаторах UpApA, UpApG и UpGpA. Когда в участок, на котором на рибосоме проходит отбор мономера, попадает такой кодон, связывания какой-либо аминоацил-тРНК не происходит и синтез полипептидной цепи прекращается. При этом проходит гидролиз сложноэфирной связи, соединяющей синтезированный полипептид с тРНК, т. е. освобождение полипептида.

Каждая молекула информационной РНК (мРНК) помимо полирибонуклеотидной последовательности, программирующей некоторую последовательность аминокислот, содержит дополнительные нетранслируемые области как с 3′-, так и с 5′-конца. У прокариотических мРНК непосредственно перед инициаторным кодоном находится специальная олигопуриновая последовательность из шести нуклеотидов, комплементарная 3′-концевому фрагменту рибосомной РНК малой субъединицы (последовательность Шайна — Дельгарно). Образование комплекса между этими олигорибонуклеотидными фрагментами играет важную роль в обеспечении фиксации инициаторного кодона в декодирующем участке активного центра рибосомы. У многих эукариотических мРНК на 5′-конце имеется специфическая структура, называемая кэпом (от англ. cap — шапочка). Типичная структура кэпа имеет вид



96

На 3′-конце многих эукариотических мРНК имеется довольно протяженный фрагмент, состоящий только из остатков адениловой кислоты. Этот поли (A)-фрагмент не входит в состав первичного транскрипта, т. е. не запрограммирован непосредственно в гене, а присоединяется с помощью специального фермента — *полинуклеотид аденилилтрансферазы* (КФ 2.7.7.19).

Общие сведения о строении рибосом приведены в § 3.8. В процессе трансляции рибосомы должны одновременно взаимодействовать с мРНК и двумя молекулами тРНК, одна из которых несет на 3′-конце пептидный фрагмент, а другая — аминоацильный. Участки рибосомы, на которых связываются эти тРНК, соответственно называют P-участком и A-участком (или P-сайтом и A-сайтом от англ. site — место). Многочисленные данные свидетельствуют, что в обоих участках тРНК связаны с соответствующими кодонами. Область рибосомы, с которой в A-участке взаимодействуют прочитываемый кодон и антикодон отбираемой им аминоацил-тРНК, называют участком декодирования. После отбора аминоацил-тРНК происходит перенос пептидного фрагмента на α-аминогруппу аминоацил-тРНК. Участок рибосомы, на котором происходит этот процесс и который, следовательно, содержит каталитический центр для переноса пептида, называется пептидилтрансферазным участком. Поскольку, как следует из пространственной структуры тРНК (см. рис. 29), расстояние между 3′-концом тРНК и антикодоновой петлей порядка 8 нм, пептидилтрансферазный и декодирующий участки на рибосоме удалены друг от друга. Известно, что они вообще находятся на разных субъединицах рибосом: декодирующий – на малой, а пептидилтрансферазный — на большой субъединице. Молекулы тРНК располагаются на рибосоме таким образом, что взаимодействуют с обеими субъединицами, причем на большой субъединице в районе пептидилтрансферазного центра сближены их 3′-концевые CpCpA фрагменты, а на малой субъединице вблизи декодирующего участка — их антикодоновые петли.

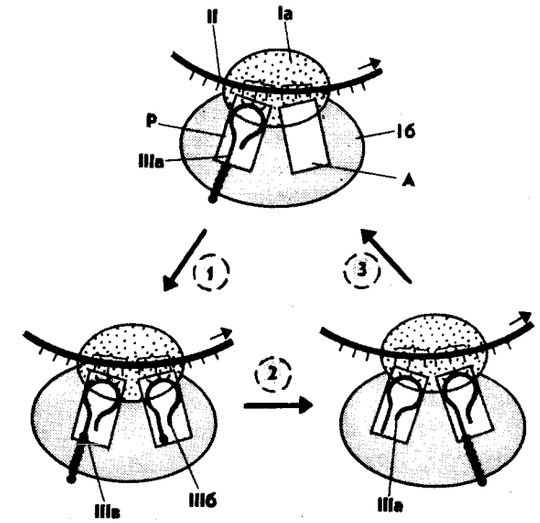


Рис. 55. Схема цикла элонгации при биосинтезе белка на рибосоме:

1 – отбор аминоацил-тРНК; *2* – образование пептидной связи; *3* – транслокация; Ia, Iб – малая и большая субъединицы рибосомы; II – мРНК (стрелка указывает направление от 5ρ- к 3-концу); IIIа, IIIб, IIIв – тРНК, аминоацил- и пептидил-тРНК; A и P–A- и P-сайты

После переноса пептидного остатка аминоацил-тРНК, находящаяся в A-участке, превращается в пептидил-тРНК. В соответствии с общей схемой матричного биосинтеза за этим должна следовать транслокация, перемещающая ее в P-участок и освобождающая A-участок для отбора следующей аминоацил-тРНК. Вмес-

те с пептидил-тРНК должен переместиться и связанный с ней кодон. Схема цикла элонгации с учетом всего сказанного приведена на рис. 55.

В системе, состоящей из рибосом, мРНК и набора аминоацил-тРНК, может идти процесс трансляции, т.е. синтезироваться полипептид с последовательностью аминокислот, соответствующей последовательности кодонов мРНК. Однако в столь упрощенной системе синтез идет медленно и весьма чувствителен к действию различных неблагоприятных факторов. Реально в клетках в синтезе белка на стадии элонгации участвуют два дополнительных белка, не входящих в состав рибосомы и называемых *факторами элонгации*. В общем случае их обозначают как EF-1 и EF-2 (elongation factors 1 и 2).

Для прокариотических факторов элонгации сохранились первоначально введенные обозначения фактор Tu и фактор G. EF—1 в комплексе с ГТФ связывает любые молекулы аминоацил-тРНК, кроме Met—$tRNA_i^{Met}$ (последняя взаимодействует аналогичным образом с одним из факторов, участвующих в инициации, которые в этом курсе не рассматриваются). Отбору в этом случае подвергается не свободная аминоацил-тРНК, а связанная в тройной комплекс EF-1·PPP—Guo·$NH_3^+CHR_iCO$—O—$tRNA^{(i)}$. В таком виде происходит первичный отбор аминоацил-тРНК с участием кодона мРНК. В результате взаимодействия EF-1 с рибосомой в нем активируется присущая ему ГТФазная активность и происходит гидролиз β—γ-пирофосфатной связи в ГТФ. Образующийся комплекс EF-1·PP—Guo теряет сродство к рибосоме и диссоциирует. Только после этого аминоацил-тРНК оказывается в А-участке рибосомы в таком положении, что способна принять пептидный остаток от пептидил-тРНК, расположенной в Р-участке. Таким образом, стадия *1* на схеме, представленной на рис. 55, складывается из трех главных этапов - отбора тройного комплекса, гидролиза ГТФ до ГДФ и ортофосфата и диссоциации комплекса EF-1·PP—Guo. После замены ГДФ на ГТФ фактор EF-1·PPP—Guo может связаться с новой молекулой аминоацил-тРНК и опять включиться в цикл элонгации. В замене ГДФ на ГТФ принимает участие еще один белковый фактор, который в случае прокариот известен как фактор EF-Ts. Комплекс EF-Tu·PP—Guo весьма прочен, и ГДФ вытесняется только при взаимодействии с EF-Ts:

$$\text{EF-Tu·PP—Guo} + \text{EF-Ts} \longrightarrow \text{EF-Tu·EF—Ts} + \text{PP—Guo}$$

За этим следует процесс

$$\text{EF-Tu·EF—Ts} + \text{PPP} - \text{Guo} \longrightarrow \text{EF-Tu·PPP—Guo} + \text{EF—Ts}$$

После освобождения рибосомы от фактора EF-1 следует перенос пептидного остатка, т. е. образование новой пептидной связи, по-видимому, не требующий непосредственного участия факторов элоганции. Но для последующей эффективности транслокации необходим сходный процесс, протекающий с участием фактора EF-2. Комплекс EF-2·PPP—Guo связывается с рибосомой, содержащей пептидил-тРНК в А-участке, в результате чего происходит транслокация пептидил-тРНК и прочитанного кодона в Р-участок и освобождение А-участка. За транслокацией следует гидролиз ГТФ до ГДФ и ортофосфата и диссоциация второго фактора элонгации. Таким образом, стадия *3* схемы, представленной на рис. 55, также складывается из трех главных этапов - связывания комплекса EF-2·PPP—Guo, приводящего к транслокации, гидролиза ГТФ и удаления фактора с рибосомы.

Рибосомы, как и РНК-полимеразы, являются точками приложения действия ряда антибиотиков, в том числе таких широко используемых в медицинской практике как стрептомицин, хлорамфеникол и тетрациклин, структуры которых приведены в § 2.5. Бактерицидное действие первых двух связано с их способностью специфично взаимодействовать только с прокариотическими рибосомами. Стрептомицин связывается с малой субъединицей, хлорамфеникол - с большой субъединицей вблизи пептидилтрансферазного центра рибосомы, подавляя тем самым биосинтез белков у бактерий и не затрагивая биосинтез зараженного человека или животного. Тетрациклин обладает способностью взаимодействовать с малыми субъединицами в А-участках как прокариотических, так и эукариотических рибосом. Этим он препятствует отбору аминоацил-тРНК в А-участке и блокирует белковый синтез. Однако клеточные мембраны животных для него непроницаемы, и при введении его в живой организм избирательно подавляется именно биосинтез у бактерий.

5.7. ОСОБЫЕ СЛУЧАИ РЕПЛИКАЦИИ И ТРАНСКРИПЦИИ У ВИРУСОВ

Молекулярные события, лежащие в основе репликации и транскрипции в клетках прокариот и эукариот, в своих главных чертах достаточно однотипны. Значительно более разнообразны варианты протекания этих процессов при воспроизводстве генетического материала вирусов. В данном параграфе рассматриваются некоторые наиболее существенные и широко представленные в мире вирусов особые пути протекания матричного биосинтеза нуклеиновых кислот. Вследствие самой природы вирусов эти процессы протекают в клетках хозяина, инфицированных вирусами.

Ряд специфических особенностей наблюдается даже у вирусов, генетический материал которых, как и у клеток, представлен двунитевой ДНК. Например, у аденовирусов - возбудителей широкого спектра заболеваний у человека и животных — инициация репликации не требует создания РНК–праймера. Зрелая частица (*вирион*) аденовируса содержит на 5′-концах каждой из цепей двунитевой вирусной ДНК специальный белок, который фосфодиэфирной связью через гидроксигруппу одного из остатков серина связан с 5′-концевым остатком дезоксицитидин-5′-фосфата (дЦМФ). Этот белок синтезируется в инфицированных клетках по программе, заложенной в вирусной ДНК. Новосинтезированные молекулы белка присоединяют дЦМФ и связываются с 3′-концом одной из материнских цепей вирусной ДНК, причем дЦМФ взаимодействует с 3′-концевым остатком дГМФ этой цепи. В таком виде остаток дЦМФ выступает в роли праймера для ситнеза новой дочерней цепи. Благодаря этому вся цепь синтезируется в один прием, образования фрагментов *Оказаки* не требуется, и ДНК–лигаза в создании новых молекул вирусной ДНК не участвует. Одновременно или с некоторым запозданием совершенно аналогичный процесс может начаться на второй материнской нити. Схема репликации аденовирусной ДНК представлена на рис. 56.

Особенно много нетрадиционных процессов связано с воспроизводством вирусов, вирионы которых в качестве генетического материала содержат либо кольцевую однонитевую ДНК, либо одно– или двунитевую РНК.

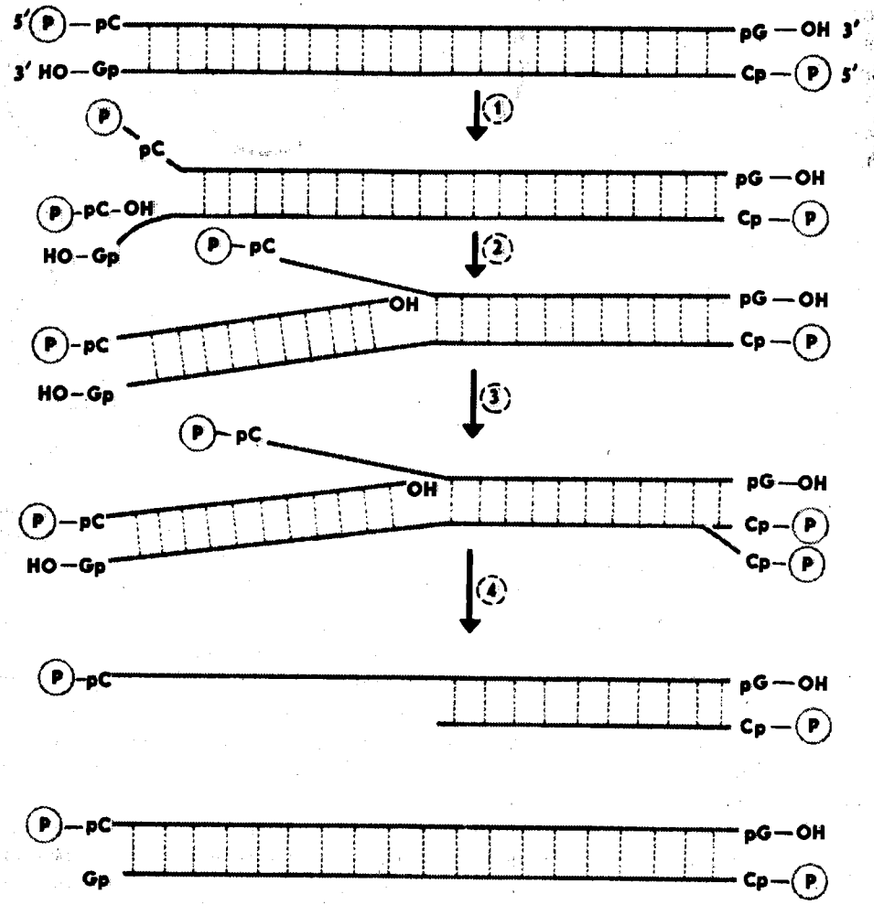


Рис. 56. Схема репликации ДНК аденовируса:

1 — образование комплекса нижней материнской цепи с белком Р, несущим фрагмент ЦМФ (pC); *2* — синтез дочерней цепи на матрице нижней цепи; *3* — образование комплекса верхней цепи с P-pC и начало элонгации дочерней ДНК на верхней цепи; *4* — завершение репликации нижней цепи

Для вирусов, вирионы которых содержат однонитевую ДНК, первой стадией репликации является синтез в инфицированной клетке комплементарной цепи, т.е. образование двунитевой *репликативной формы* ДНК. При этом цепь ДНК, входящая в вирион, называется плюс-цепью, а создаваемая на ней, как на матрице, комплементарная ДНК - минус-цепью. Инициация и элонгация синтеза минус-цепи идут с участием ферментов клеток хозяина. Механизмы инициации достаточно разнообразны. Например, при синтезе минус-цепи ДНК фага φX 174 в инициации участвует сложный комплекс белков, включающий праймазу. ДНК фага M13 имеет специальную шпильку, стебель которой работает как полноценный двунитевой фрагмент по отношению к РНК-полимеразе клетки. Поэтому затравка образуется с помощью хозяйской РНК-полимеразы.

После завершения инициации в работу включается ДНК-полимераза III,

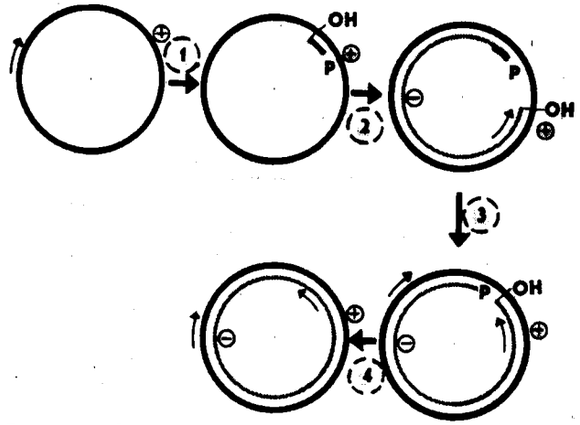


Рис. 57. Схема образования репликативной формы ДНК фага, содержащего с зрелом вирусе однонитевую ДНК:

1 – образование РНК-праймера (жирная линия); *2* – элонгация минус-цепи ДНК-полимеразой III; *3* – застройка оставшейся бреши ДНК-полимеразой I и вытеснение рибоолигонуклеотидного фрагмента в результате 5′→3′-экзонуклеазной активности; *4* – ликвидация разрыва в минус-цепи с помощью ДНК-лигазы; OH – 3′-концевая гидроксигруппа; P – 5′-концевая фосфомоноэфирная группа

которая ведет основную часть элонгации минус-цепи. Когда процесс близок к завершению и синтезированный продукт вместе с плюс-цепью образует двунитевую структуру с небольшой брешью в минус-нити, последняя застраивается с участием ДНК-полимеразы I. Этот же фермент, используя свою 5′-3′-экзонуклеазную активность, вытесняет рибонуклеотидные фрагменты, сохранившиеся со времени образования праймера. Процесс завершается действием ДНК-лигазы, которая превращает минус-цепь в замкнутую кольцевую молекулу (рис. 57). Полученная двунитевая структура называется репликативной формой I (RF-I). Эта двунитевая ДНК может служить матрицей для РНК-полимеразы хозяина, т.е. программировать синтез характерных для вируса мРНК, а с помощью последних - набора вирусных белков: структурных, т. е. входящих в состав вириона, и неструктурных, необходимых на разных этапах функционирования вируса внутри клетки, в том числе для сборки зрелых вирусных частиц.

На минус-цепи, как на матрице, начинается производство новых плюс-цепей. Вначале они преимущественно используются для создания новых репликативных структур. Затем, по мере накопления в клетке структурных белков бактериофага, на плюс-цепях начинают формироваться новые фаговые частицы.

Механизм репликации, используемый для производства плюс-цепей, также нетрадиционен. Процесс происходит по схеме, получившей название катящегося кольца (рис. 58). Процесс начинается с образования в определенной точке в составе RF-I плюс-цепи гидролитического разрыва, приводящего к появлению свободной 3′-гидроксигруппы и, соответственно, 5′-концевой фосфомоноэфирной группы. У бактериофага φX 174, механизм репликации которого изучен наиболее полно, разрыв происходит под действием специального, программируемого фаговой ДНК белка, известного как белок A. Разрывы, подобные тому, который образуется при действии на репликативную ДНК белка A, часто фигурируют в литературе под названием «ник» (от англ. nick – щель, надрез).Двунитевая кольцевая ДНК с ником в плюс-цепи называется репликативной формой II или RF-II. Появившаяся гидроксигруппа играет роль праймера, с которого начинается процесс элонгации. Такая элонгация по своей сути означает синтез новой плюс-цепи, ковалентно связанной с исходной.

По мере синтеза новой цепи исходная цепь вытесняется из двунитевой структуры в виде выступающего из нее хвоста, длина которого постепенно возрастает.

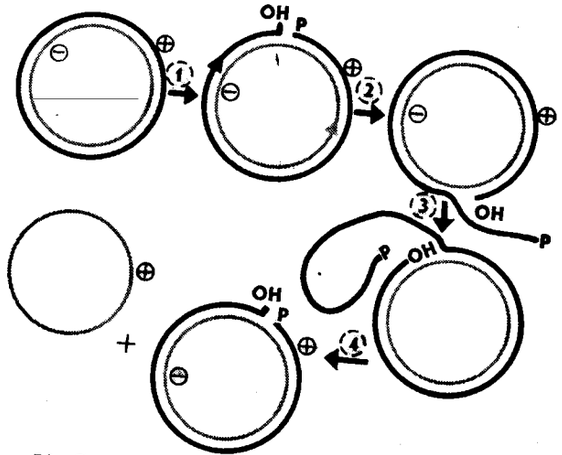


Рис. 58. Схема репликации по способу катящегося кольца:

1 – превращение репликативной формы RF-I в форму RF-II с разрывом (ником) в плюс-цепи; *2* – элонгация плюс-цепи с 3′-конца с вытеснением участка исходной плюс-цепи; *3* – завершение полного оборота синтеза плюс-цепи; *4* – отщепление в виде кольцевой молекулы плюс-цепи и регенерация формы RF-II

а основание которого вместе с 3′–концом растущей полинуклеотидной цепи вращается (катится) вокруг кольцевой минус-цепи. К моменту, когда будет завершен полный оборот вокруг минус–цепи, выступающая цепь будет по первичной структуре полностью соответствовать ДНК вириона. На этом этапе при участии белка А происходит отщепление этой цепи с замыканием ее в кольцевую молекулу. Одновременно с этим восстанавливается в первоначальном виде структура RF–II, на которой начитается создание новой плюс–цепи.

Вирусы, содержащие в качестве генетического материала РНК, можно разделить на две основные группы: обычные РНК–содержащие вирусы и ретровирусы. Последняя группа представляет особый интерес, так как включает в себя вирусы, вызывающие опухолевые заболевания, и вирус HIV, вызывающий синдром приобретенного иммунодефицита, СПИД.

Бóльшая часть обычных РНК–содержащих вирусов имеет в составе вириона РНК, которая одновременно является информационной РНК, программирующей на рибосомах хозяина синтез структурных и неструктурных вирусных белков, и генетической структурой, способной к самовоспроизведению. Для выполнения последней функции в этих РНК, которые принято квалифицировать как плюс–цепи, запрограммирован специальный фермент, катализирующий синтез РНК на матрицах РНК. Этот фермент называют РНК–зависимой РНК–полимеразой или сокращенно РНК–репликазой. Вирусные плюс–РНК, попав в клетку, прежде всего начинают функционировать в качестве мРНК, чтобы обеспечить производство необходимого числа молекул репликазы. Затем с помощью РНК–репликазы на вирионной РНК производится минус–цепь, которая далее используется в качестве матрицы для создания новых плюс–цепей. У вирусов, содержащих в составе вириона плюс–РНК, репликаза является неструктурным белком, т.е. в состав вирионных частиц не входит. К числу таких вирусов относятся некоторые бактериофаги, например паразитирующие в клетках *E.coli* фаги MS2, R17 $Q\beta$. Аналогично устроены и функционируют многие вирусы растений, в том числе один из наиболее изученных вирус табачной мозаики. Сходным образом работают и некоторые вирусы, вызывающие тяжелые нейроинфекции у человека, – вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки, вирус бешенства.

Даже в пределах только что описанной группы вирусов разнообразие используемых механизмов достаточно велико. Например, уже упомянутый фаг $Q\beta$ содержит в составе своей РНК программу только для синтеза одной субъединицы РНК–репликазы. Остальные три субъединицы, превращающие синтезированный по вирусной программе полипептид в активный фермент, берутся у клетки хозяина – это фактор элонгации биосинтеза белка EF–Tu, вспомогательный белковый фактор EF–Ts и белок малой рибосомной субъединицы S1.

Наряду с только что описанными вирусами, содержащими в составе вириона плюс–РНК,известна группа вирусов, содержащих в зрелой частице минус–РНК. К их числу относится вирус гриппа. Его дополнительной особенностью является то обстоятельство, что геном разрезан по большей части на отдельные гены – в состав вириона входит восемь разных полирибонуклеотидных цепей. Само по себе попадание в клетку минус–РНК к развитию инфекции привести не может, так как они не являются программами для синтеза вирусных белков. Для появления этих программ необходимо образование плюс–цепей, однако они не могут возникнуть в отсутствие РНК–репликазы, поскольку в клетках хозяина такой фермент не производится. Поэтому в состав вирионов этой группы вирусов наряду с минус–РНК входят ферменты репликации (у вируса гриппа таких ферментов три), т. е. у таких вирусов РНК–репликазы являются структурными белками. Эти ферменты попадают в клетку хозяина во время вирусной инфекции вместе с вирусом РНК, на которой, как на матрице, начинается синтез плюс–цепей. По мере их появления в инфицированной клетке развивается синтез вирусных белков, в том числе новых молекул репликаз, синтез новых минус–цепей на плюс–цепях, и в конечном итоге возникают новые частицы вируса.

Совершенно иначе функционируют *ретровирусы*. Их вирионы содержат РНК–зависимую ДНК–полимеразу (обратную транскриптазу), катализирующую обратную транскрипцию – синтез новых молекул ДНК по программе, задаваемой вирусной РНК. С помощью этого фермента в зараженной клетке производится единственная однонитевая ДНК–копия вирусной РНК, которая при участии ферментов хозяина превращается в двунитевую ДНК. По ходу обратной транскрипции в качестве промежуточных образований возникают гибридные ДНК-РНК-структуры, одна цепь которых происходит из РНК вириона, а другая – из продукта обратной транскрипции. Постепенно вирионная РНК в этом гибриде разрушается, поскольку РНК–зависимой ДНК–полимеразе свойственна активность РНКазы H – способность катализировать гидролиз полирибонуклеотидной цепи в составе РНК – ДНК-гибрида (см. § 5.4). По мере разрушения РНК синтезированная однонитевая ДНК становится матрицей для формирования комплементарной ДНК–цепи. Полученная двунитевая ДНК встраивается с помощью специальных рекомбинационных механизмов в ДНК хозяина, т. е. становится частью его хромосомы. В дальнейшем новые молекулы вирусной РНК и вирусных белков, необходимые для образования новых вирусных частиц и развития инфекции, производятся с участием общих систем транскрипции и трансляции клеток хозяина.

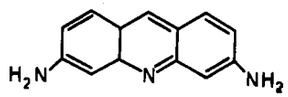
Задачи

5.1. Эксперимент Мезельсона и Сталя доказал, что репликация ДНК *E.coli* протекает по полуконсервативному механизму. Как выглядели бы результаты эксперимента, если бы репликация протекала по тем изученным [illegible] при котором обе

цепи ДНК после репликации содержат в случайном порядке фрагменты как родительской, так и дочерней ДНК?

5.2. Фрагмент транскрибируемой цепи вирусной ДНК содержит последовательность: 5′-CTTACGTACCATAAACGCAACC-3′. Какая последовательность мРНК будет ей соответствовать? Какие аминокислотные последовательности могут транскрибироваться с этого участка мРНК при совмещении рамки считывания: а) с инициирующим кодоном, б) с кодоном-терминатором? Какой особенностью обладает этот участок вирусной ДНК?

5.3. Клетки, продуцирующие белок, содержащий фрагмент с последовательностью Gly—Ser—Val—Ala—Trp—Lys—Asp—Gly, обработали профлавином:



При взаимодействии с ДНК это соединение способно встраиваться (интеркалировать) в двойную спираль между соседними основаниями параллельно им и растягивать спираль, вызывая мутации. В данном случае получили поколение клеток, продуцирующих укороченный неполноценный белок с концевой последовательностью Gly—Ser—Val—Ala. Объясните результат.

5.4. Для транскрипции in vitro в плазмиду, содержащую промотор фага T7, был встроен ген, фрагмент которого, несущий транскрибируемую цепь с участком промотора, имеет последовательность: 5′-CGACTCGAACTTTCATCTCTCCCTATAG-3′. Для синтеза мРНК с этой ДНК к плазмиде была добавлена ДНК-зависимая РНК-полимераза фага T7, АТФ, УТФ и ГТФ. Напишите последовательность продукта транскрипции.

5.5. Для синтеза пептида в бесклеточной прокариотической системе на мРНК с транслируемой последовательностью AUGUUCCCACGUGCCGUU в систему добавили полирибосомы, набор аминоацилированных тРНК, ГТФ, факторы инициации в фактор Tu. Что будет представлять собой продукт трансляции?

5.6. Как следует изменить нуклеотидную последовательность ДНК, чтобы, сохранив аминокислотную последовательность, удалить сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BamHI? Считайте, что первый нуклеотид сайта узнавания совпадает с первым нуклеотидом кодона. Каким методом это можно осуществить?

5.7. В экспрессирующую плазмиду встроен ген, в котором сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции EcoRI начинается с G, входящего в триплет первого метионина. Встройте в этот белок дополнительный трипептид. Какие ограничения налагаются на строение этого трипептида?

ГЛАВА 6

ФЕРМЕНТЫ. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

Уникальная активность и селективность действия ферментов стимулировали интенсивные усилия, направленные на выяснение механизма их действия. Эта проблема складывается из двух главных аспектов: кинетического и структурного. Структурный аспект сводится к решению двух вопросов: 1) как ферменты узнают строго определенные субстраты; 2) как они обеспечивают высокую скорость ферментативного процесса. Для этого необходимо было установить, как расположен субстрат на молекуле фермента, какие группы участвуют в его узнавании, и на этом основании предположить, как некоторые из этих групп обеспечивают каталитический механизм протекания процесса. Наиболее существенная информация была получена методом рентгеноструктурного анализа, который в общих чертах описывается в § 7.13. Если для работы фермента требуется кофактор, то необходимо иметь данные о расположении на молекуле фермента этого кофактора. В настоящее время изучено большое число ферментов. В этой главе детально рассмотрено несколько ферментативных реакций, для которых такие исследования уже проведены.

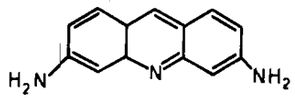
Основополагающие законы кинетики ферментативных реакций были установлены уже в начале XX в. Было постулировано, что реакции протекают при прямом контакте фермента и веществ, претерпевающих ферментативное превращение — субстратов, и было выведено простейшее кинетическое выражение для скорости такого превращения — уравнение Михаэлиса—Ментен. Исследования ферментов показало, что катализируемые ими реакции чрезвычайно чувствительны к условиям протекания, таким, как температура, ионная сила и pH среды. Поэтому в § 6.2 будет затронут и вопрос о влиянии pH и температуры. Кроме того, многие, не подвергающиеся химическому превращению вещества оказывают либо ускоряющее, либо замедляющее действие на ферментативный процесс. Поэтому в этой главе рассматриваются также вопросы об активации и ингибировании ферментативных процессов.

Важным событием в энзимологии — науке о ферментах — было открытие каталитического действия рибонуклеиновых кислот. Исследование РНК-ферментов — рибозимов — стало одной из бурно развивающихся областей энзимологии. Поэтому авторы сочли необходимым ввести § 6.4. Наконец, чтобы дать читателю возможность заглянуть в будущее энзимологии, авторы заключают эту главу небольшим разделом, посвященным динамическим аспектам молекулярной биологии, которая в настоящее время находится на самой фазе развития

цепи ДНК после репликации содержат в случайном порядке фрагменты как родительской, так и дочерней ДНК?

5.2. Фрагмент транскрибируемой цепи вирусной ДНК содержит последовательность: 5′-CTTACGTACCATAAACGCAACC-3′. Какая последовательность мРНК будет ей соответствовать? Какие аминокислотные последовательности могут транскрибироваться с этого участка мРНК при совмещении рамки считывания: а) с инициирующим кодоном, б) с кодоном-терминатором? Какой особенностью обладает этот участок вирусной ДНК?

5.3. Клетки, продуцирующие белок, содержащий фрагмент с последовательностью Gly—Ser—Val—Ala—Trp—Lys—Asp—Gly, обработали профлавином:



При взаимодействии с ДНК это соединение способно встраиваться (интеркалировать) в двойную спираль между соседними основаниями параллельно им и растягивать спираль, вызывая мутации. В данном случае получили поколение клеток, продуцирующих укороченный неполноценный белок с концевой последовательностью Gly—Ser—Val—Ala. Объясните результат.

5.4. Для транскрипции in vitro в плазмиду, содержащую промотор фага T7, был встроен ген, фрагмент которого, несущий транскрибируемую цепь с участком промотора, имеет последовательность: 5′-CGACTCGAACTTTCATCTCTCCCTATAG-3′. Для синтеза мРНК с этой ДНК к плазмиде была добавлена ДНК-зависимая РНК-полимераза фага T7, АТФ, УТФ и ГТФ. Напишите последовательность продукта транскрипции.

5.5. Для синтеза пептида в бесклеточной прокариотической системе на мРНК с транслируемой последовательностью AUGUUCCCACGUGCCGUU в систему добавили полирибосомы, набор аминоацилированных тРНК, ГТФ, факторы инициации в фактор Tu. Что будет представлять собой продукт трансляции?

5.6. Как следует изменить нуклеотидную последовательность ДНК, чтобы, сохранив аминокислотную последовательность, удалить сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BamHI? Считайте, что первый нуклеотид сайта узнавания совпадает с первым нуклеотидом кодона. Каким методом это можно осуществить?

5.7. В экспрессирующую плазмиду встроен ген, в котором сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции EcoRI начинается с G, входящего в триплет первого метионина. Встройте в этот белок дополнительный трипептид. Какие ограничения налагаются на строение этого трипептида?

ГЛАВА 6

ФЕРМЕНТЫ. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

Уникальная активность и селективность действия ферментов стимулировали интенсивные усилия, направленные на выяснение механизма их действия. Эта проблема складывается из двух главных аспектов: кинетического и структурного. Структурный аспект сводится к решению двух вопросов: 1) как ферменты узнают строго определенные субстраты; 2) как они обеспечивают высокую скорость ферментативного процесса. Для этого необходимо было установить, как расположен субстрат на молекуле фермента, какие группы участвуют в его узнавании, и на этом основании предположить, как некоторые из этих групп обеспечивают каталитический механизм протекания процесса. Наиболее существенная информация была получена методом рентгеноструктурного анализа, который в общих чертах описывается в § 7.13. Если для работы фермента требуется кофактор, то необходимо иметь данные о расположении на молекуле фермента этого кофактора. В настоящее время изучено большое число ферментов. В этой главе детально рассмотрено несколько ферментативных реакций, для которых такие исследования уже проведены.

Основополагающие законы кинетики ферментативных реакций были установлены уже в начале XX в. Было постулировано, что реакции протекают при прямом контакте фермента и веществ, претерпевающих ферментативное превращение — субстратов, и было выведено простейшее кинетическое выражение для скорости такого превращения — уравнение Михаэлиса—Ментен. Исследования ферментов показало, что катализируемые ими реакции чрезвычайно чувствительны к условиям протекания, таким, как температура, ионная сила и pH среды. Поэтому в § 6.2 будет затронут и вопрос о влиянии pH и температуры. Кроме того, многие, не подвергающиеся химическому превращению вещества оказывают либо ускоряющее, либо замедляющее действие на ферментативный процесс. Поэтому в этой главе рассматриваются также вопросы об активации и ингибировании ферментативных процессов.

Важным событием в энзимологии — науке о ферментах — было открытие каталитического действия рибонуклеиновых кислот. Исследование РНК-ферментов — рибозимов — стало одной из бурно развивающихся областей энзимологии. Поэтому авторы сочли необходимым ввести § 6.4. Наконец, чтобы дать читателю возможность заглянуть в будущее энзимологии, авторы заключают эту главу небольшим разделом, посвященным динамическим аспектам молекулярной биологии, которая в настоящее время находится в начальной фазе изучения.

6.1. АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ ФЕРМЕНТОВ

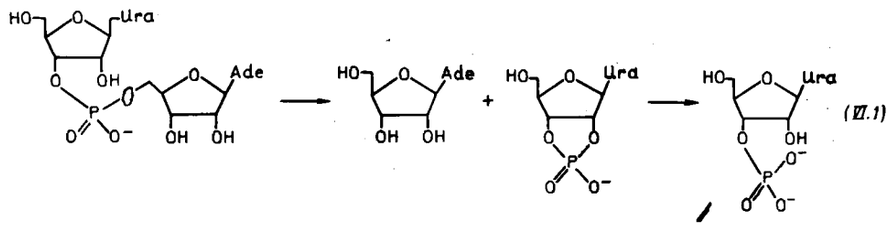
Ферменты действуют на превращающийся субстрат или на взаимодействующие молекулы двух или трех субстратов только при прямом контакте с ними, т.е. необходимой стадией процесса, катализируемого ферментом (ферментативного превращения), является образование комплекса фермента с субстратом или субстратами.

При этом участники химического превращения непосредственно взаимодействуют с ограниченной частью белковой молекулы, называемой *активным центром*. Селективность действия ферментов определяется высокоизбирательным узнаванием субстратов их активными центрами. Часть активного центра, ответственную за селективное связывание, иногда называют *адсорбционным центром* фермента. Ту часть активного центра, которая принимает непосредственное участие в каталитическом процессе, называют *каталитическим центром*. Эти два центра могут в известной мере перекрываться.

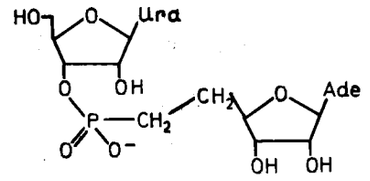
Информацию о строении активных центров ферментов и расположении в них субстратов получают в первую очередь путем рентгеноструктурного анализа самого фермента и его комплекса с каким-либо близким аналогом субстрата, который достаточно похож на субстрат, чтобы располагаться в активном центре сходным с ним образом, но не может подвергаться ферментативному превращению. Такой комплекс может быть закристаллизован и использован для получения необходимого набора данных по дифракции рентгеновских лучей.

В отдельных случаях удается подобрать такие условия кристаллизации, в которых каталитического превращения субстрата не происходит, и это дает возможность исследовать методом рентгеноструктурного анализа комплекс фермент – субстрат.

Сказанное можно пояснить на примере фермента, активный центр и механизм действия которого достаточно хорошо изучены и который будет ниже детально рассматриваться, — панкреатической рибонуклеазы. Этот фермент катализирует двустадийный гидролиз фосфодиэфирных связей в РНК, сходный в общих чертах со щелочным гидролизом этих связей. На первой стадии происходит внутримолекулярная атака атома P на 2′-OH-группу примыкающего со стороны 3′-кислородного атома остатка рибозы с образованием циклического 2′,3′-фосфата и разрывом межнуклеотидной связи. Во второй стадии происходит гидролиз пятичленного фосфодиэфирного цикла. На примере одного из простейших субстратов рибонуклеазы — уридилил(3′→5′)аденозина — процесс можно записать в виде



Аналог этого субстрата, у которого вместо одного из атомов кислорода рибозофосфатного остова находится метиленовая группа



97

очень близок по структуре, но ферментом не гидролизуется и поэтому может образовать стабильный комплекс с рибонуклеазой. Рентгеноструктурный анализ этого комплекса позволил получить важные сведения о строении активного центра фермента и вместе с другими данными сформулировать механизм каталитического действия фермента. Этот механизм хорошо объясняет все основные отличия ферментативного гидролиза от протекающего по сходной схеме щелочного гидролиза. Эти отличия сводятся к следующему: во-первых, процесс, ката-

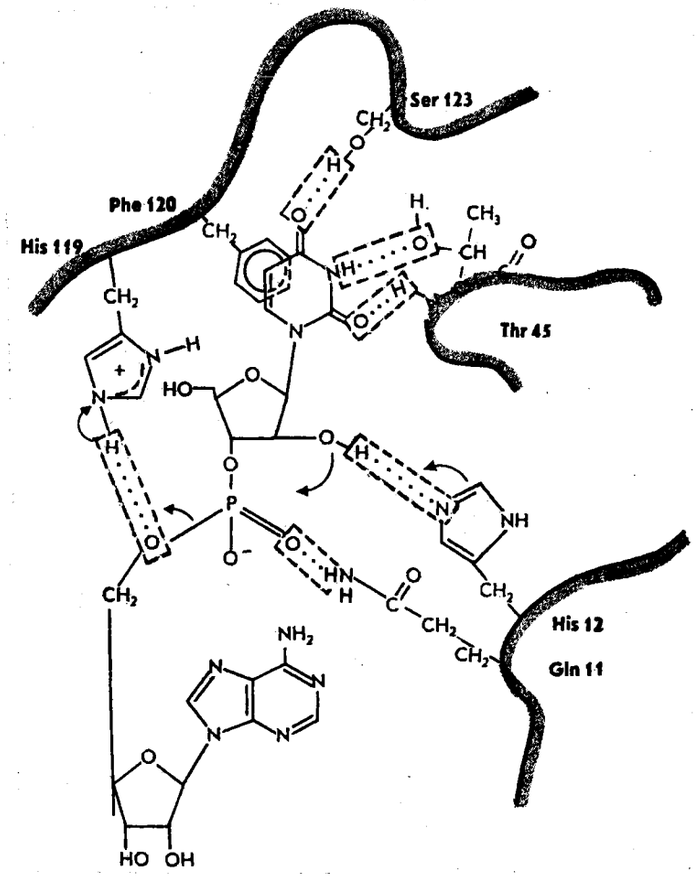


Рис. 59. Схема активного центра рибонуклеазы в форме, благоприятствующей протеканию первой стадии реакции

лизируемый ферментом, протекает с большой скоростью при нейтральных и слабощелочных значениях pH, при которых скорость щелочного гидролиза неизмеримо мала. В нейтральной среде среднее время превращения цитидин-2′, 3′-циклофосфата в составе комплекса с ферментом на три порядка меньше, чем время химического превращения того же субстрата в 1М щелочи. Во-вторых, нуклеозид, примыкающий к атому P со стороны 3′-кислородного атома, в случае ферментативного гидролиза должен быть пиримидиновым нуклеозидом, причем в случае аналогов уридина или цитидина они должны быть по структуре таковы, чтобы резко предпочтительной была *анти*-конформация гликозидной связи; в-третьих, фермент катализирует только гидролиз фосфодиэфирных связей, образованных 3′- и 5′-гидроксилами соседних нуклеозидных фрагментов, в то время как щелочному гидролизу в равной степени подвержены и связи, образованные 2′- и 5′-гидроксигруппами; в-четвертых, при гидролизе циклического фосфата фермент дает исключительно 3′-концевой фосфат, в то время как при щелочном гидролизе в близких количествах образуются 2′- и 3′-изомеры.

Все эти особенности получают свое объяснение при рассмотрении активного центра рибонуклеазы, схема которого приведена на рис. 59. Видно, что реакционная часть молекулы, включающая остаток фосфорной кислоты и 2′-гидроксигруппу рибозы, располагается вблизи двух имидазольных колец остатков гистидина, His-12 и His-119 (номера показывают положение соответствующих остатков в полипептидной цепи фермента). Поскольку p*K* имидазольных колец незначительно отличаются от 7, протонированная и непротонированная формы обоих колец присутствуют в соизмеримых количествах, т.е. в популяции молекул

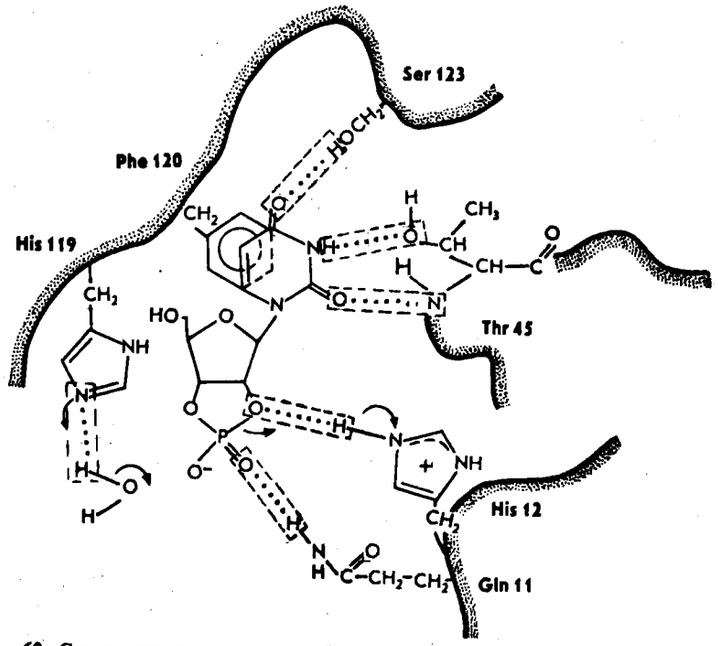


Рис. 60. Схема активного центра рибонуклеазы в форме, благоприятствующей протеканию второй стадии реакции

фермента в измеримых количествах присутствуют формы со всеми четырьмя мыслимыми распределениями заряженных и незаряженных колец. На рис. 59 приведена форма, которая благоприятствует первой стадии реакции. Заряженный имидазольный остаток His-119 подает протон, необходимый для образования 5′-гидроксигруппы аденозина, а непротонированный His-12 отнимает протон от 2′-гидроксигруппы, атакуемой атомом P. Вероятная схема синхронного смещения электронных пар обозначена на рисунке стрелками. Таким образом, остатки His-12 и His-119 работают в этом процессе соответственно как основной и кислотный катализаторы. На рис. 60 аналогичная схема приведена для второй стадии реакции. Вместо ушедшего из активного центра остатка аденозина на его место попадает молекула воды. Происходит сходный процесс, но теперь His-12 играет роль кислотного, а His-119 — основного катализатора, т.е. рабочей является форма с протонированным His-12 и незаряженным His-119.

В обоих процессах депротонирование и протонирование атома 2′-O происходит с участием His-12, который расположен по отношению к остатку рибозы именно со стороны этого атома. Если бы в активном центре оказался такой же динуклеозидфосфат с 2′ ⟶ 5′-межнуклеотидной связью, непротонированный имидазольный цикл His-12 не имел бы контакта со свободной 2′-гидроксигруппой, будучи экранирован от нее фосфодиэфирным фрагментом. Отсюда проистекает абсолютная специфичность фермента именно к 3′ ⟶ 5′-фосфодиэфирным группам. По этой же причине протонированный His-12 на стадии гидролиза циклофосфата подает протон именно на атом 2′-O, что приводит к количественному превращению 2′, 3′-циклофосфата в 3′-фосфат.

Чтобы субстрат в активном центре имел необходимую ориентацию относительно каталитических групп, он должен быть фиксирован на ферменте по нескольким точкам. Связывание остатка фосфорной кислоты обеспечивается образованием водородных связей и электростатическим взаимодействием с остатками His-12 и His-119, один из которых протонирован, и с остатком глутамина Gln-11. В связывании гетероцикла участвуют остаток серина Ser-123, остаток фенилаланина Phe-120, находящийся в частичном стекинге с пиримидиновым кольцом субстрата, и две группы остатка треонина Thr-45 — его гидроксигруппа и NH-группа полипептидного остова. Для такого связывания необходимо, чтобы пиримидиновый нуклеотид находился в *анти*-конформации. Переход в *син*-конформацию нарушает образование водородных связей с остатком Thr-45, необходимое для правильного закрепления субстрата в активном центре. Размеры области, в которой располагается гетероцикл, недостаточны для размещения в ней пуринового гетероцикла.

Таким образом, установленные экспериментально структура активного центра и схема расположения в нем аналога субстрата логично объясняют все характерные особенности действия панкреатической рибонуклеазы.

Из сказанного видно, что белок, который в данном случае сам по себе является ферментом и не требует участия дополнительных кофакторов, выполняет две главные функции: узнает специфичный субстрат, ориентируя его в составе комплекса нужным образом относительно имидазольных колец двух остатков гистидина, и осуществляет с помощью этих двух остатков, формирующих каталитический центр фермента, общий кислотный и основной катализ на обеих стадиях гидролиза. Эти функции — наиболее общие для всех белков, являющихся ферментами или входящими в их состав.

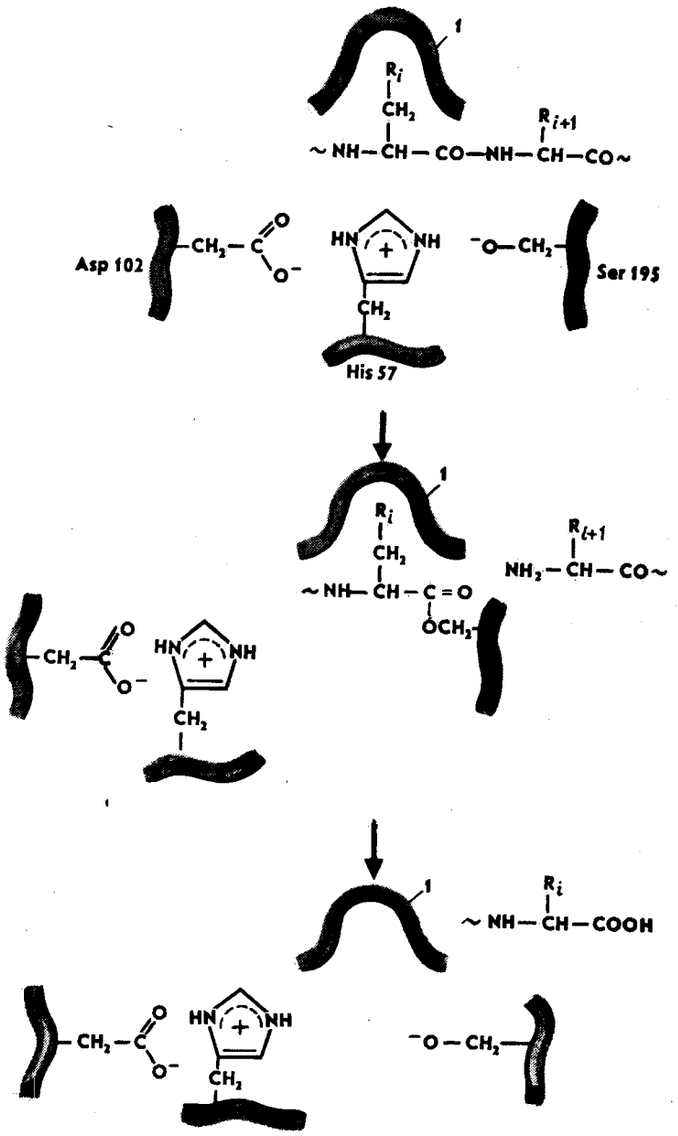


Рис. 61. Схема активного центра сериновых протеаз и механизм их действия:

1 – карман, участвующий в опознавании бокового радикала R_i

Помимо кислотно-основного катализа белки могут в отдельных случаях осуществлять нуклеофильный катализ. Наиболее изученной группой белков-ферментов, осуществляющих нуклеофильный катализ, являются довольно многочисленные ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей в полипептидах, относящиеся к так называемым *сериновым протеазам*. С точки зрения механизма

действия наиболее обстоятельно исследованы три пищеварительных фермента — трипсин, химотрипсин и эластаза. Эти ферменты отличаются лишь специфичностью по отношению к природе аминокислотного остатка, по карбонильной группе которого происходит расщепление полипептидной цепи. В случае трипсина этот остаток должен нести достаточно удаленный от полипептидного остова положительный заряд.

Из природных аминокислот этому условию удовлетворяют остатки лизина и аргинина. В случае химотрипсина этот остаток должен содержать гидрофобный, предпочтительно ароматический радикал. Поэтому расщепление преимущественно проходит по остаткам фенилаланина, тирозина и триптофана. В случае эластазы расщепление проходит, если боковой радикал имеет небольшой размер, главным образом по остаткам глицина и аланина. Эта специфичность определяется структурой полости, в которой размещается боковой радикал атакуемого аминокислотного остатка для осуществления необходимой ориентации относительно каталитического центра фермента.

Каталитический центр для всех трех ферментов представлен тремя главными аминокислотными остатками — серином, гистидином и аспартатом. В случае химотрипсина это остатки Ser-195, His-57 и Asp-102. Схема их взаимного расположения представлена на рис. 61.

Наличие рядом с OH-группой серина положительно заряженного имидазольного кольца резко облегчает ионизацию этой группы серина, так что в значительной, а возможно, и подавляющей части молекул она находится в виде соответствующего аниона. Протонирование имидазольного цикла His-57 осуществляется с помощью расположенной рядом с ним карбоксильной группы остатка Asp-102. Ионизация резко повышает нуклеофильный характер остатка серина, который атакует пептидную связь с отщеплением C-концевой половины расщепляемого полипептида и образованием продукта ковалентного присоединения его N-концевой половины по остатку Ser-195 в виде ацилфермента. На второй стадии ацилфермент гидролизуется с отщеплением N-концевой половины гидролизуемого полипептида и регенерацией активного центра. Схема двустадийного гидролиза пептидной связи сериновыми протеазами, таким образом, может быть записана в виде

$$\overset{+}{N}H_3CHR_1-\ldots-NHCHR_iCO-NHCHR_{i+1}CO-\ldots-NHCHR_nCOO^- + HOCH_2-E \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \overset{+}{N}H_3CHR_1-\ldots-NHCHR_iCO-OCH_2-E + NH_2CHR_{i+1}CO-\ldots-NHCHR_nCOO^- \qquad (\text{VI}.2)$$

$$\overset{+}{N}H_3CHR_1-\ldots-NHCHR_iCO-OCH_2-E \xrightarrow{H_2O} \overset{+}{N}H_3CHR_1-\ldots-NHCHR_iCOOH + HOCH_2-E$$

В большом числе случаев, особенно если речь идет о видах катализа, для осуществления которых белковые молекулы не приспособлены (электрофильный, окислительно-восстановительный катализ), белковые молекулы, составляющие основу фермента, сами по себе, каталитически не активны и становятся катализаторами лишь в сочетании со специальными *кофакторами* — ионами металлов или сложными органическими молекулами. Последние часто называют *простетическими группами*, а лишенные кофактора белковые компоненты фермента — *апоферментами*.

В качестве примера фермента, работающего с участием кофактора, на рис. 62 приведена схема активного центра *карбоксипептидазы А* — пищеварительного

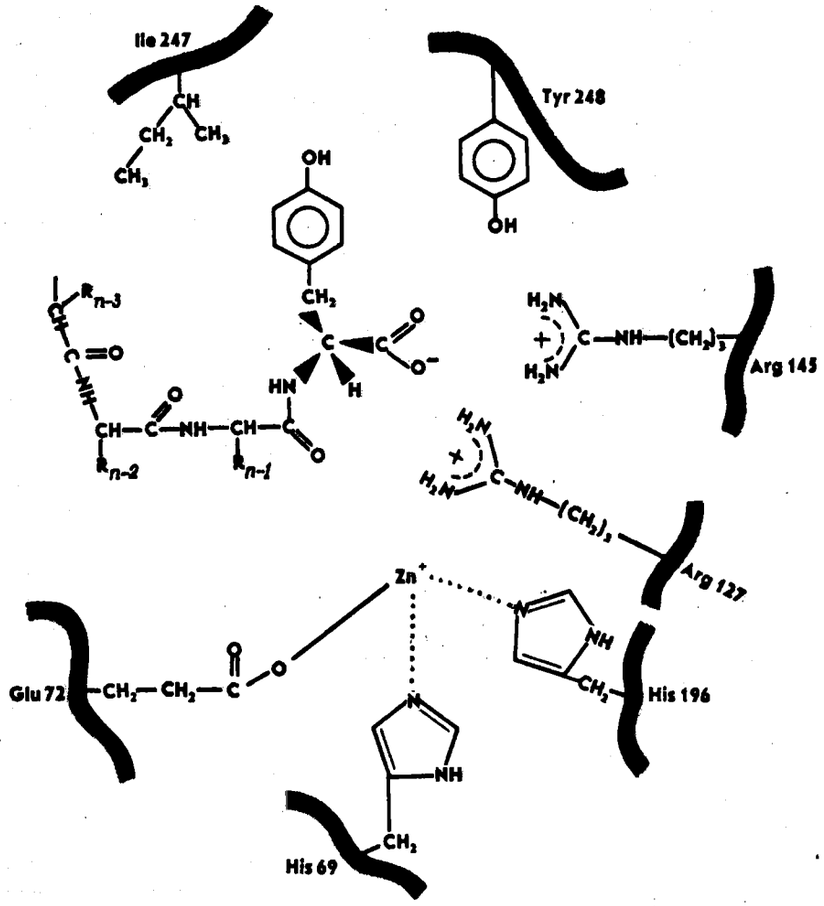


Рис. 62. Схема активного центра карбоксипептидазы А
(остаток Туг 198 на схеме не изображен)

фермента, катализирующего гидролитическое отщепление С-концевого аминокислотного фрагмента от полипептидов. Фермент абсолютно специфичен к L-конфигурации отщепляемого аминокислотного остатка и резко преимущественно катализирует отщепление остатков гидрофобных аминокислот. Гидролиз в этом случае протекает по механизму электрофильного катализа и требует участия иона цинка — в белке какие-либо группы, способные выступать в роли электрофильных катализаторов, отсутствуют. Ион цинка фиксирован в активном центре фермента путем координации тремя аминокислотными остатками — двумя остатками гистидина His-69 и His-196 и одним глутамат-ионом Glu-72. Четвертая координата (для ионов цинка характерна тетраэдрическая sp^3-конфигурация координационных связей) направлена в комплексе фермент — субстрат на карбонильную группу гидролизуемой пептидной связи. Фиксация С-концевой части гидролизуемого пептида в активном центре обеспечивается в первую очередь взаимодействием с двумя остатками аргинина — Arg-145 и Arg-127 и кластером гидрофобных аминокислотных остатков — Туг-198, Туг-248 и Ile-247. Положительно заряженные остатки аргинина взаимодействуют с С-концевой карбоксильной группой. Это взаимодействие является главным фактором, обеспечивающим селективность карбоксипептидазы именно к С-концевым аминокислотам. Гидрофобные компоненты активного центра обеспечивают преимущественную фиксацию в нем гидрофобных С-концевых остатков. Уже из этого рассмотрения становится ясной абсолютная стереоспецифичность фермента — при аналогичной посадке D-аминокислотного остатка в сторону каталитического центра — координированного иона Zn^+ — будет направлен атом Н при хиральном атоме С. Дополнительно стереоспецифичность обеспечивается формой полости, в которой происходит фиксация субстрата. Внутренняя поверхность полости в направлении связанного с хиральным центром С-концевой аминокислоты атома Н достаточно близка к нему и не допускает замены его на какой-либо превышающий его по размеру фрагмент без существенной деформации полости. Поэтому даже связывание С-концевого фрагмента в D-конфигурации затруднено.

В случае карбоксипептидазы *А* аминокислотные остатки апофермента, как и в случае рибонуклеазы, обеспечивают отбор и нужную ориентацию субстрата относительно активного центра. Кроме того, специальные остатки аминокислот участвуют в связывании кофактора — иона цинка.

В белках отсутствуют какие-либо группы, способные участвовать в окислительно-восстановительном катализе. В тех случаях, когда такой катализ необходим для осуществления окислительно-восстановительного превращения, в качестве кофакторов используются ионы металлов переменной валентности или специальные органические молекулы, такие как гем (1) и флавиновые коферменты (68 а, б и 69).

Во всех случаях, как это видно на примере карбоксипептидазы *А*, белок организует работу кофактора наиболее эффективным образом. Более того, в зависимости от структуры белка может усиливаться одна из присущих кофактору нескольких функций, в результате чего в разных комплексах один и тот же кофактор играет существенно разную роль. Например, гем в комплексе с глобином в незначительной мере проявляет свою склонность к окислительно-восстановительным превращениям и функционирует в основном как комплекс, координирующий молекулу O_2. В каталазе в комплексе с соответствующим апоферментом он проявляет способность катализировать двухэлектронное окисление — восстановление H_2O_2. В цитохроме с тот же гем выполняет функцию одноэлектронного переносчика, меняя в каждом акте переноса электрона состояние иона железа от Fe(II) к Fe(III) и обратно.

Таким образом, из приведенных примеров следует, что белок в роли фермента или апофермента принимает участие в выполнении четырех главных функций. Во-первых, белок обеспечивает специфичное опознавание субстратов, приводящее к образованию комплекса, в котором реагирующие части этих субстратов необходимым образом ориентированы относительно каталитического центра. Во-вторых, он принимает участие в каталитическом акте своими кислыми и основными группами по механизму общего кислотно-основного катализа. В-третьих, в ряде случаев ковалентно связывает часть молекулы субстрата с образованием промежуточного продукта, выступая в этом случае в качестве нуклеофильного катализатора. В-четвертых, в качестве апофермента белок обеспечивает связывание в активном центре иона или молекулы кофактора.

Этим функции белка как фермента или апофермента скорее всего не исчерпываются. Все рассмотренные механизмы предполагали достаточно статичное расположение функциональных групп белка в активном центре. Это не совсем верно. Взаимодействие с субстратом нередко сопровождается изменением конформации белковой молекулы, и согласно теории, выдвинутой Кошландом, направленные конформационные изменения белка являются важным фактором ферментативного превращения. В отдельных случаях такие изменения зарегистрированы с помощью рентгеноструктурного анализа. Например, карбоксипептидаза *А* была подвергнута рентгеноструктурному анализу как в отсутствие субстрата, так и в комплексе с глицил-L-тирозином. Полость, в которой находится активный центр, существенно сужается при связывании этого субстрата, т.е. наблюдается отчетливый конформационный переход. Кроме того, широко дискутируется и имеет в отдельных случаях убедительные подтверждения гипотеза, согласно которой фермент фиксирует субстрат в конформации, существенно более близкой по своей геометрии к активированному комплексу реакции, чем конформация субстрата, преобладающая у несвязанных молекул. Это, естественно, должно приводить к снижению активационного барьера реакции и способствовать существенному ускорению превращения.

Изучение механизма действия ферментов как с целью выявления общих принципов ферментативного катализа, так и для установления деталей механизмов отдельных конкретных ферментативных реакций остается одной из центральных задач теоретической биохимии. Наряду с огромным мировоззренческим значением эта задача приобретает большую практическую значимость, поскольку открывает перспективу сознательного конструирования более совершенных молекул ферментов и апоферментов. Спроектированные молекулы могут быть затем получены путем химического синтеза соответствующих полипептидов или методами генетической и белковой инженерии, которые вкратце рассматриваются в § 7.11.

6.2. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Ферментативное превращение происходит в *комплексе фермент — субстрат* и может в достаточно хорошем приближении рассматриваться как мономолекулярное превращение этого комплекса. Это превращение может в терминах § 3.10 рассматриваться как ответ системы на образование комплекса, и для описания можно воспользоваться приведенными в этом параграфе соотношениями. В энзимологии по традиции принято использовать несколько другие обозначения. Фермент (энзим) обозначают буквой E, а специфический лиганд, субстрат ферментативного превращения, — буквой S. Кроме того, обычно для характеристики комплексообразования используют не константу ассоциации, а константу диссоциации комплекса K_s. С учетом этих обозначений для типичного случая, когда полная концентрация субстрата s намного превосходит полную концентрацию фермента [E], выражение для концентрации комплекса фермент — субстрат на основании уравнения (3.6) запишется в виде

$$[ES] = \frac{[E]_t}{1 + (K_s/s)}, \tag{6.1}$$

а выражение для скорости v ферментативной реакции — в виде

$$v = \frac{k_{кат}[E]_t}{1 + (K_s/s)}, \tag{6.2}$$

где $k_{кат}$ — константа скорости превращения комплекса фермент — субстрат в продукт реакции с регенерацией свободного фермента.

Более строгое рассмотрение должно учитывать, что соотношение между свободными ферментом и субстратом и их комплексом не является равновесным. Комплекс ES не только диссоциирует, но и претерпевает превращение в свободный фермент и продукт реакции. Поэтому следует говорить не о термодинамически равновесной концентрации комплекса, а о его квазистационарной концентрации, которая устанавливается вскоре после начала превращения в результате выравнивания скоростей образования и расходования комплекса по обоим путям. Для этого нужно записать схему процесса в несколько усложненном виде:

$$\begin{gathered} E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \\ ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P \end{gathered} \tag{6.3}$$

Здесь P — продукт реакции.

Условие квазистационарности при этом записывается в виде

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_{кат}[ES] \tag{6.4}$$

или с учетом того, что

$$[E] + [ES] = [E]_t$$

в виде

$$k_1[E]_t[S] = (k_{-1} + k_{кат} + k_1[S])[ES]$$

и, следовательно, концентрация комплекса после установления квазистационарного режима будет равна

$$[ES] = \frac{k_1[E]_t[S]}{k_{-1} + k_{кат} + k_1[S]} = \frac{[E]_t}{1 + \dfrac{k_{-1} + k_{кат}}{k_1[S]}},$$

а скорость ферментативного превращения

$$v = \frac{k_{кат}[E]_t}{1 + \dfrac{k_{-1} + k_{кат}}{k_1[S]}}. \tag{6.5}$$

Это выражение при концентрации субстрата, существенно превышающей концентрацию фермента, по характеру зависимости скорости от концентрации субстрата S идентично (6.2), однако вместо константы диссоциации комплекса стоит несколько более сложная величина

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{кат}}{k_1}, \qquad (6.6)$$

называемая *константой Михаэлиса*. Сравнение с (6.4) показывает, что эта константа характеризует соотношение между концентрациями E, S и ES в условиях квазистационарности

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}. \qquad (6.7)$$

Из (6.5) следует, что по мере увеличения концентрации субстрата при неизменной концентрации фермента скорость стремится к предельному значению, которое в энзимологии принято называть *максимальной скоростью*:

$$V_{max} = k_{кат}[E]_t. \qquad (6.8)$$

С учетом этого выражение (6.5) можно записать в виде

$$v = \frac{V_{max}}{1 + K_M/s}. \qquad (6.9)$$

В такой форме оно известно в биохимии как *уравнение Михаэлиса — Ментен*. Так как задаваемая им зависимость v от s по характеру идентична зависимости ответа системы от концентрации специфического лиганда, то уравнение Михаэлиса может быть представлено в виде линейных анаморфоз, аналогичных (3.13) и (3.14), которые в обозначениях, принятых в энзимологии, имеют вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M/V_{max}}{s}, \qquad (6.10)$$

$$v = V_{max} - K_M\frac{v}{s}. \qquad (6.11)$$

Для иллюстрации на рис. 63 приведена в координатах $1/v - 1/s$ зависимость скорости гидролиза карбобензилоксиглицилфенилаланина, катализируемого карбоксипептидазой *А*, от концентрации субстрата. На рис. 64 в координатах

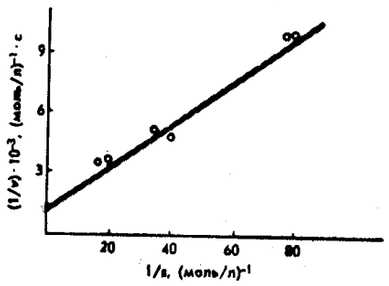


Рис. 63. Зависимость скорости гидролиза карбобензилоксиглицилфенилаланина под действием карбоксипептидазы от концентрации субстрата в координатах $1/v - 1/s$ (по данным Кауфмана и Нейрата)

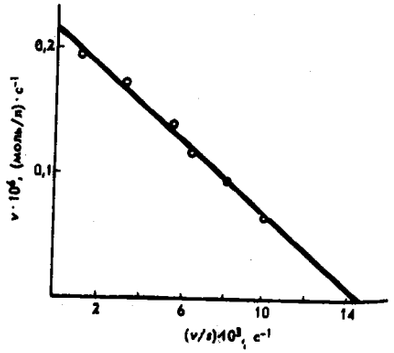


Рис. 64. Зависимость скорости гидролиза аденозинтрифосфата, катализируемого миозином, от концентрации аденозинтрифосфата в координатах $v - v/s$ (по данным Лейдлера)

$v - v/s$ приведена аналогичная зависимость для гидролиза АТФ, катализируемого мышечным белком миозином, который принимает непосредственное участие в превращении избыточной энергии пирофосфатной связи АТФ в механическую энергию мышечного сокращения.

Схема (6.3) является простейшей схемой ферментативного превращения. Согласно ей фермент пребывает в двух состояниях — в свободном виде, когда его функцией является отбор молекулы субстрата, и в виде комплекса с субстратом, когда его функцией является собственно ферментативное превращение. По мере повышения концентрации субстрата s среднее время, необходимое для эффективной встречи с субстратом, уменьшается, тогда как время внутримолекулярного превращения комплекса в фермент и продукт остается неизменным. Достижение максимальной скорости означает достижение столь высоких значений s, что время на встречу свободного фермента с субстратом становится малым по сравнению с временем каталитического превращения, т.е. времени на поиск очередной молекулы субстрата фермент практически не затрачивает.

Константа Михаэлиса в определенной мере характеризует сродство фермента к субстрату. Так как эта величина является аналогом константы диссоциации комплекса ES, то чем ниже K_M, тем выше сродство. В то же время K_M, как следует из (6.6), превышает константу диссоциации комплекса ES. Как видно из уравнения (6.9), K_M численно равна значению s, при котором достигается значение скорости, равное половине от V_{max}.

Данные по зависимости v от s в квазистационарном режиме позволяют определить значения двух параметров: K_M и V_{max}, что, в свою очередь, дает возможность вычислить константу скорости каталитического превращения $k_{кат}$. Значения k_1 и k_{-1} по отдельности из этих величин не определяются и могут быть найдены лишь при постановке специальных экспериментов, например наблюдения за кинетикой превращения субстрата в период установления квазистационарного режима (предстационарная кинетика). Этот период, как правило, измеряется малыми долями секунды, поэтому применяют экспериментальные методы кинетики быстрых реакций — метод остановленного потока и метод температурного скачка. Изложение теории и экспериментальной техники этих методов выходит за рамки данного курса.

Схема (6.3) является простейшей, так как предполагает участие в реакции одного субстрата и необратимость реакции. Уже для односубстратной обратимой реакции схема усложняется и число кинетических параметров, необходимых для ее описания, возрастает. Усложняется и вид кинетического уравнения. Еще в большей мере это относится к двух- и трехсубстратным реакциям. Систематическое изложение этого вопроса можно найти в специальных руководствах по кинетике ферментативных реакций. В качестве примера более сложного случая ниже рассматривается необратимая реакция, протекающая с участием двух субстратов S_1 и S_2, причем предполагается, что имеет место определенный порядок их присоединения, а именно: сначала присоединяется S_1 с образованием комплекса ES_1, а затем уже S_2 с образованием полного комплекса, в котором и происходит ферментативное превращение. Схема записывается в виде

$$E + S_1 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

$$ES_1 + S_2 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} ES_1S_2$$

$$ES_1S_2 \xrightarrow{k_{кат}} E + P$$

Кинетическое уравнение в этом случае имеет вид

$$v = k_{кат}[ES_1S_2].$$

В случае достаточного избытка субстратов над ферментом концентрация трехкомпонентного комплекса может быть выражена через полную концентрацию фермента, полные концентрации субстратов S_1 и S_2, кинетические параметры, условия материального баланса по всем трем ферментным формам E, ES_1 и ES_1S_2 и условия квазистационарности по промежуточным комплексам ES_1 и ES_1S_2:

$$[E] + [ES_1] + [ES_1S_2] = [E]_t,$$

$$k_1s_1[E] + k_{-2}[ES_1S_2] = k_{-1}[ES_1] + k_2s_2[ES_1],$$

$$k_2s_2[ES_1] = k_{-2}[ES_1S_2] + k_{кат}[ES_1S_2].$$

После несложных алгебраических выкладок получается уравнение для необратимой двусубстратной ферментативной реакции с определенным порядком присоединения субстратов в виде

$$v = \frac{k_{кат}[E]_t}{1 + \frac{1}{k_1}\frac{1}{s_1} + \frac{k_{-2} + k_{кат}}{k_2}\frac{1}{s_2} + \frac{k_{-1}}{k_1}\frac{k_{-2} + k_{кат}}{k_2}\frac{1}{s_1}\frac{1}{s_2}}. \qquad (6.12)$$

При достаточно больших концентрациях обоих субстратов достигается значение максимальной скорости V_{max}, равное, как и в случае односубстратной реакции, $k_{кат}[E]_t$. Из экспериментально найденной зависимости v от s_1 и s_2 могут быть найдены параметры $k_{кат}$, k_1, k_{-1}/k_1, т.е. k_{-1} и $(k_{-2} + k_{кат})/k_2$. Последняя величина представляет собой константу Михаэлиса для второго субстрата.

Даже простейшее кинетическое уравнение ферментативной реакции содержит несколько кинетических параметров, каждый из которых зависит от температуры и среды, в которой протекает реакция, в первую очередь от pH и ионной силы. Если эксперименты проводятся в присутствии органических растворителей, то кинетические параметры также зависят от природы добавленного растворителя и его содержания в растворе. Характер всех указанных зависимостей различен для разных ферментов. Ниже вкратце рассмотрены вопросы, связанные с влиянием pH раствора и температуры на скорость ферментативных реакций.

Ферменты, как правило, работают в определенном диапазоне pH и характеризуются некоторым оптимальным значением pH, при котором при прочих равных условиях скорость реакции имеет наибольшее значение. Причины такого характера зависимости можно пояснить на примере кинетики гидролиза цитидин-2′,3′-фосфата, катализируемого панкреатической рибонуклеазой. Как следует из рис. 60, изображающего активный центр фермента на второй стадии реакции расщепления РНК, каталитически активной является форма фермента, у которой остаток имидазола, принадлежащий His-12, протонирован и способен подать протон на атом 2′-O циклофосфатного фрагмента, а остаток имидазола, принадлежащий His-119, не протонирован и способен принять протон у атакующей молекулы воды. Естественно, что ни в существенно кислой среде, когда оба остатка гистидина протонированы, ни в существенно щелочной среде, когда оба остатка лишены протонов, каталитическое превращение осуществляться не будет. Процесс возможен лишь в некоторой промежуточной области, в которой содержание монопротонированной формы достаточно велико.

В общем случае можно высказать следующее положение: каталитически активной является только та часть молекулы фермента, у которой группы, принимающие участие в общем кислотном катализе, протонированы, а принимающие участие в общем основном катализе — не протонированы. Доля каталитически активной формы фермента в связи с этим зависит от pH раствора, и именно это является главным фактором, определяющим влияние pH на скорость ферментативной реакции. В свете сказанного выражение для максимальной скорости реакции можно записать в виде

$$V_{max} = k_{кат}^{(ист)}\,\alpha_{ES}[E]_t, \qquad (6.13)$$

где $k_{кат}^{(ист)}$ — истинная, не зависящая от pH константа скорости каталитического превращения в комплексе субстрата с каталитически активной формой; α_{ES} — доля этой формы. Конкретный вид зависимости α_{ES} — pH зависит от того, сколько и каких именно групп, состояние протонирования которых существенно для каталитического превращения, имеется в активном центре фермента. Для случая панкреатической рибонуклеазы эта величина может быть записана в виде

$$\alpha_{ES} = \left[1 + \frac{K_1'}{K_2'} + \frac{K_1'}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2'}\right]^{-1}, \qquad (6.14)$$

где K_1' и K_2' — константы ионизации протонированных имидазольных циклов остатков His-12 и His-119 в составе комплекса фермент — циклофосфат. Значения соответствующих pK при 25°C, найденные из экспериментальной зависимости $k_{кат}$ для гидролиза цитидин-2′,3′-циклофосфата, составляют: $pK_1' = 9{,}0$, $pK_2' = 6{,}15$.

Сходная, хотя и несколько более сложная, картина получается и для зависимости от pH константы Михаэлиса. С учетом активной в связывании субстрата доли свободного фермента α_E и доли формы активной в связывании субстрата α_S условие квазистационарности для комплекса фермент — субстрат можно записать в виде

$$k_{-1}^{(ист)}\,\alpha_{ES}[ES] + k_{кат}^{(ист)}\,\alpha_{ES}[ES] = k_1^{(ист)}\,\alpha_E\alpha_S[E][S], \qquad (6.15)$$

где $k_1^{(ист)}$ и $k_{-1}^{(ист)}$ — истинные, не зависящие от pH константы скорости ассоциации и диссоциации комплекса фермент — субстрат. Сопоставление этого выражения с (6.7) позволяет записать выражение для константы Михаэлиса в виде

$$K_M = \frac{k_{-1}^{(ист)} + k_{кат}^{(ист)}}{k_1^{(ист)}}\,\frac{\alpha_{ES}}{\alpha_E\alpha_S} = K_M^{(ист)}\,\frac{\alpha_{ES}}{\alpha_E\alpha_S}, \qquad (6.16)$$

т.е. ввести понятие истинной, не зависящей от pH константы Михаэлиса $K_M^{(ист)}$

Для случая гидролиза цитидин-2′3′-циклофосфата, катализируемого панкреатической рибонуклеазой, выражения для α_E и α_S имеют вид

$$\alpha_E = \left(1 + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2}\right)^{-1}, \quad \alpha_S = 1 + \frac{[H^+]}{K_S},$$

где K_1 и K_2 — константы ионизации протонированных имидазольных колец His-12 и His-119 в свободном ферменте ($pK_1 = 6{,}15$, $pK_2 = 5{,}85$); K_S — константа ионизации для некоторой группы субстрата, которая для узнавания ферментом должна находиться в непротонированном состоянии. Насколько можно судить по величине pK этой группы (4,05), таковой является атом N3 остатка цитозина. Общий вид зависимости V_{max} и K_M от pH для этой реакции приведен на рис. 65.

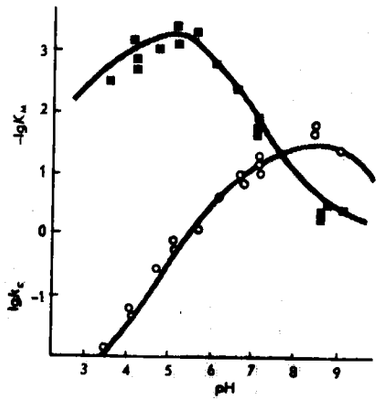


Рис. 65. Зависимость V_{max} и K_M от pH для реакции гидролиза цитидин-2′,3′-циклофосфата, катализируемого панкреатической рибонуклеазой, в координатах $\lg k_c$ - pH (где $k_c = V_{max}/[E]_t$) и $\lg K_M$ - pH (по данным Ефтинка и Билтонена)

Проведенное рассмотрение показывает, что зависимость кинетических параметров ферментативной реакции от pH позволяет в ряде случаев получить сведения о природе групп фермента, формирующих активный центр фермента.

Влияние температуры на скорость ферментативного превращения в первую очередь определяется зависимостью от температуры отдельных констант скорости, которые обычно достаточно хорошо описываются уравнением Аррениуса. Для понимания механизма ускоряющего действия ферментов на реакции важной является зависимость от температуры величины $k_{кат}$, поскольку она дает представления о высоте энергетического барьера, преодолеваемого комплексом фермент — субстрат в ходе каталитического акта. Как правило, высота этого барьера существенно ниже, чем для аналогичной неферментативной реакции. Например, для гидролиза цитидин-2′,3′-циклофосфата энергия активации, найденная из зависимости $k_{кат}$ от температуры, составляет 31,5 кДж/моль, причем в основном это обусловлено температурной зависимостью константы ионизации протонированного имидазола в активном центре фермента. Для зависимости $k_{кат}^{(ист)}$ от температуры, т.е. для барьера, преодолеваемого комплексом каталитически активной формы фермента с субстратом, барьер составляет всего лишь 4,2 кДж/моль. В то же время для реакции гидролиза того же циклофосфата, катализируемой имидазолом, и для прямого гидролиза водой эти величины составляют соответственно 46 и 71 кДж/моль при близких во всех трех случаях значениях энтропии активации (соответственно —204, —210 и —168 Дж·моль$^{-1}$·К$^{-1}$). В ряде случаев характер зависимости может усложняться в результате смещения равновесия между различными конформациями фермента, различающимися по своим каталитическим характеристикам, при изменении температуры.

При изучении влияния как pH, так и температуры на скорость ферментативного превращения, необходимо следить, чтобы изменение pH или повышение температуры не выходило за допустимые пределы, индивидуальные для каждого фермента, так как это может привести к необратимой потере им каталитической активности (инактивации фермента). В этом случае в ходе ферментативного превращения может происходить падение скорости реакции, вызванное уменьшением полной концентрации сохранивших активность молекул, т.е. величины $[E]_t$. Если кинетические измерения проводятся с целью получения кинетических параметров, следует ограничиваться измерениями начальной скорости превращения, т.е. проводить эксперименты в течение непродолжительного времени, за которое вкладом инактивации фермента можно пренебречь. Если же речь идет об использовании фермента как катализатора для получения некоторого продукта превращения или для удаления какого-либо нежелательного компонента из реакционной смеси, то следует подбирать оптимальную температуру, при которой положительный эффект, связанный с увеличением скорости реакции в результате повышения температуры, еще перевешивает эффект замедления от постепенно нарастающей во времени потери фермента в результате инактивации.

6.3. ИНГИБИРОВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Скорость ферментативных реакций помимо перечисленных в предыдущем параграфе факторов в большинстве случаев подвержена влиянию некоторых соединений, специфичных для каждого фермента. Одни из этих соединений ускоряют каталитический процесс — *активаторы*, другие замедляют его — *ингибиторы ферментов*. По принципу действия эти соединения можно разделить на три основные группы.

Первая группа — близкие аналоги субстратов, содержащие весь набор или, по крайней мере, бóльшую часть групп, узнаваемых активным центром фермента, и поэтому образующие комплекс фермент — аналог, сходный с комплексом фермент — субстрат. Однако в силу специфики своей структуры они не подвергаются ферментативному превращению. Занимая активный центр, эти аналоги препятствуют связыванию субстрата и тем самым ферментативной реакции. Они фактически конкурируют с субстратом за взаимодействие с активным центром и поэтому их называют *конкурентными ингибиторами* (см. также § 3.10). Например, соединение (95) имеет весь набор групп, узнаваемых панкреатической рибонуклеазой (см. рис. 59, 60), но CH_2-группа, стоящая вместо атома 5′-O субстрата, не способна принять протон от протонированного His-119 и расщепления связи P—C не происходит. Фенилпропионовая кислота содержит карбоксильную группу и гидрофобный фенильный радикал, в связи с чем связывается с активным центром карбоксипептидазы *A* (см. рис. 62), но не имеет амидной группировки и никакому превращению ферментом поэтому не подвергается. Оба указанных соединения являются типичными конкурентными ингибиторами соответственно панкреатической рибонуклеазы и карбоксипептидазы *A*.

Особую группу образуют кофакторы ферментов. В их отсутствие апофермент вообще не обладает каталитической активностью. Добавление их приводит к появлению каталитических свойств, причем с увеличением концентрации кофактора по мере насыщения им апофермента наблюдается ускорение каталитического превращения до некоторого предела, соответствующего полному насыщению.

Наконец, третья группа — вещества, которые взаимодействуют с дополнительными центрами фермента, не совпадающими с активным центром, причем это взаимодействие, изменяя конформацию в районе активного центра, влияет на кинетические параметры процесса. Эти дополнительные центры называют регуляторными, а сами соединения — *аллостерическими эффекторами*. У различных ферментов наблюдается и *аллостерическая активация*, и *аллостерическое ингибирование*. Эффекторы этого класса имеют важное биологическое значение, так как с их помощью осуществляется один из главных механизмов регуляции каталитической активности. Целевые, с точки зрения живого организма, продукты обычно образуются в результате цепочки биохимических превращений. Если этот продукт оказывается в недостатке, необходимо усиление работы системы ферментов, приводящих к его образованию. В случае накопления достаточного количества этого продукта целесообразно выключение всей системы приводящих к нему процессов. Поэтому в такие цепи, как правило, включены один или несколько процессов, регулируемых ферментами, подверженными аллостерической регуляции.

В качестве примера можно привести фермент *фосфофруктокиназу*, катализирующий перенос остатка фосфорной кислоты от АТФ на атом О1 фруктозо-6-фосфата:

$$CH_2OH{-}CO{-}CHOH{-}CHOH{-}CHOH{-}CH_2OPO_3^{2-} + PPP{-}Ado \longrightarrow$$
$$\longrightarrow {}^{2-}O_3POCH_2{-}CO{-}CHOH{-}CHOH{-}CHOH{-}CH_2OPO_3^{2-} + PP{-}Ado$$

Данное превращение является одним из этапов многостадийного процесса, в результате которого происходит сопряженное окисление глюкозы и фосфорилирование АДФ с накоплением АТФ (§ 8.2; 8.4; 8.5). Весь процесс, приводящий к образованию на одну полностью окисленную молекулу глюкозы 38 новых пирофосфатных связей (в рассматриваемом процессе одна из таких связей разрушается, но это с лихвой компенсируется последующими актами фосфорилирования АДФ), имеет своей главной целью пополнение энергетических запасов биологической системы в быстро утилизируемой форме, т.е. в виде пирофосфатных связей АТФ. Поэтому при накоплении в системе достаточного количества АТФ процесс целесообразно выключить или, по крайней мере, притормозить. Это и имеет место в случае фосфофруктокиназы. Наряду с центром связывания АТФ как субстрата в активном центре фермента имеется дополнительный центр, связывание с которым молекулы АТФ приводит к аллостерическому торможению реакции образования фруктозо-1,6-дифосфата. Вместе с тем расходование АТФ на процессы фосфорилирования и энергетические потребности живой системы сопровождается накоплением АДФ и АМФ, поэтому повышение концентрации последних свидетельствует о дефиците АТФ. В соответствии с этим моно- и дифосфат аденозина являются аллостерическими активаторами фосфофруктокиназы.

В простейшем случае односубстратной реакции, катализируемой ферментом, состоящим из одной субъединицы, в квазиравновесном приближении кинетическое уравнение для скорости реакции в присутствии эффектора нетрудно получить из выражения (3.18). Переходя к обозначениям, принятым в энзимологии: E — фермент, S — субстрат (первый лиганд), L — эффектор (второй лиганд); K_S — константа диссоциации комплекса ES, K_L — константа диссоциации комплекса EL, получаем

$$v = k_{кат}[E]_t \frac{\frac{s}{K_S} + \beta\gamma\frac{sl}{K_S K_L}}{1 + \frac{s}{K_S} + \frac{l}{K_L} + \beta\frac{sl}{K_S K_L}}, \qquad (6.17)$$

где s, l — концентрации субстрата S и второго лиганда L.

Анализ этого выражения показывает, что если одновременно выполняются неравенства $\beta\gamma < 1$ и $\gamma < 1$, то при любых концентрациях субстрата L функционирует как ингибитор. Если же неравенства имеют обратный знак, т.е. $\beta\gamma > 1$, $\gamma > 1$, то L функционирует как активатор.

В случае конкурентного ингибирования выражение для скорости ферментативной реакции можно получить, преобразуя аналогичным образом выражение (3.19):

$$v = k_{кат}[E]_t \left[1 + \left[\frac{K_S}{s}\right]\left[1 + \frac{l}{K_L}\right]\right]^{-1}. \qquad (6.18)$$

Такое же выражение получается в квазистационарном приближении, с той лишь разницей, что вместо константы диссоциации K_S в нем стоит константа Михаэлиса K_M. Согласно этому выражению увеличение концентрации субстрата приводит в конечном итоге к тому же значению максимальной скорости, что и в отсутствие ингибитора, однако для этого требуется более высокая концентрация субстрата. В частности, скорость, равная половине от максимальной, достигается при концентрации субстрата, равной $K_M(1 + l/K_L)$. Линейные анаморфозы (6.10) и (6.11) принимают вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \left[\frac{K_M}{V_{max}}\right]\left[1 + \frac{l}{K_L}\right]\left[\frac{1}{s}\right], \qquad (6.19)$$

$$v = V_{max} - K_M\left[1 + \frac{l}{K_L}\right]\left[\frac{v}{s}\right]. \qquad (6.20)$$

Поэтому данные экспериментов по зависимости $v - s$ при нескольких различных концентрациях ингибитора в координатах $1/v - 1/s$ должны изображаться прямыми линиями, пересекающимися на оси ординат. То же должно иметь место и в координатах $v - v/s$. На рис. 66 представлена зависимость $v - s$ для катализируемого карбоксипептидазой *A* гидролиза карбобензилоксиглицилфенилаланина без ингибитора и в присутствии двух конкурентных ингибиторов — фенилуксусной и фенилпропионовой кислот в координатах $1/v$—$1/s$. Все три прямые пересекаются в одной точке на оси ординат.

Выражение для активации фермента кофактором можно получить из (6.17), полагая, что реакция происходит только в комплексе ESL, т.е. отбрасывая в чис-

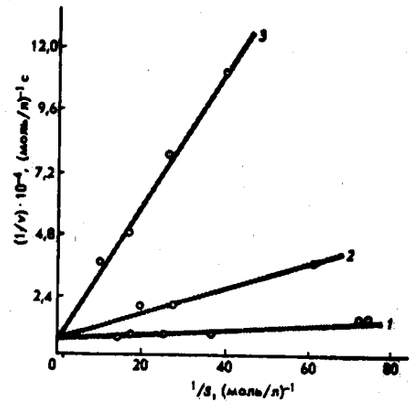


Рис. 66. Зависимость скорости гидролиза карбобензилоксиглицилфенилаланина под действием карбоксипептидазы от концентрации субстрата:

1 – без ингибитора; *2* – в присутствии 0,0002 моль/л фенилуксусной кислоты; *3* – в присутствии 0,002 моль/л фенилпропионовой кислоты в координатах $1/v$–$1/s$ (по данным Кауфмана и Нейрата)

лителе первый член, соответствующий превращению в отсутствие лиганда L. Если при этом кофактор не оказывает влияния на сродство субстрата к ферменту, т.е. $\beta = 1$, то кинетическое уравнение имеет вид

$$v = k_{\text{кат}}[\text{E}]t\frac{sl/(K_S K_L)}{(1 + s/K_S)(1 + l/K_L)} =$$

$$= k_{\text{кат}}[\text{E}]t/(1 + K_S/s)(1 + K_L/l). \qquad (6.21)$$

Для аллостерического ингибирования и аллостерической активации фермента, состоящего из одной субъединицы или двух неэквивалентных субъединиц с разнесенными по ним центрами связывания субстрата и эффектора, следует пользоваться общим выражением (6.17). Среди получаемых зависимостей принято выделять особо предельный случай, при котором эффектор (ингибитор) не влияет на сродство субстрата к ферменту, но полностью выключает активный центр. В этом случае между субстратом и ингибитором нет конкуренции и этот тип торможения ферментативной реакции называют *неконкурентным ингибированием*. Кинетическое уравнение для этого случая получают из общего выражения (6.17) в предположении, что $\beta = 1$, $\gamma = 0$ и имеет вид

$$v = \frac{k_{\text{кат}}[\text{E}]_t}{\left(1 + \frac{K_S}{s}\right)\left(1 + \frac{l}{K_L}\right)}. \qquad (6.22)$$

В координатах $1/v$–$1/s$ зависимость скорости от концентрации субстрата при разных концентрациях ингибитора L имеет вид прямых линий, пересекающихся на оси абсцисс, поскольку

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{l}{K_L}}{k_{\text{кат}}[\text{E}]_t} + \left[\frac{1 + \frac{l}{K_L}}{k_{\text{кат}}[\text{E}]_t}\right]\frac{K_S}{s}. \qquad (6.23)$$

В координатах v–v/s эти же зависимости представляют собой серию параллельных прямых линий:

$$v = \frac{k_{\text{кат}}[\text{E}]_t}{1 + \frac{l}{K_L}} - K_s\left[\frac{v}{s}\right]. \qquad (6.24)$$

Рассмотренные типы ингибиторов—конкурентные и аллостерические — действуют обратимо. Удаление их из системы полностью восстанавливает каталитическую активность фермента. Наряду с этим найдены в живой природе и получены путем химического синтеза многочисленные соединения, которые при контакте с ферментом приводят к необратимой инактивации. Как правило, это происходит в результате химической реакции такого ингибитора с каким-либо существенным для проявления каталитической активности участком фермента. Этот тип ингибирования рассматривается в § 7.17.

6.4. РИБОЗИМЫ

В начале 80-х годов произошло одно из наиболее неожиданных событий в развитии биохимии — было найдено, что в природе существуют катализаторы, лишенные белка и состоящие только из РНК. Это открытие первоначально было связано с изучением сплайсинга эукариотических РНК. Многие гены эукариот имеют мозаичную структуру (см. § 5.5) с чередующимися последовательностями экзонов, которые должны войти в конечную структуру программируемой РНК, и интронов, которые должны быть удалены в процессе созревания РНК. По аналогии с другими видами процессинга РНК первоначально считалось, что существуют специальные ферменты, катализирующие сплайсинг. Однако в ряде случаев интенсивные поиски соответствующих белков успехом не увенчались. Оказалось, что в этих случаях способность вырезать интроны и соединять после этого концы двух соседних экзонов присуща самой РНК. Впервые этот процесс был изучен на примере предшественника рРНК малой рибосомной субъединицы у одноклеточного эукариота *Tetrahymena thermophila*. Предшественник состоит из 6400 нуклеотидов, из которых 414 представляют собой интрон. Исследования показали, что вырезание интрона происходит без участия какого-либо катализатора, т.е. представляет собой самосплайсинг. Формально этот процесс не является каталитическим, поскольку происходит в каждом предшественнике всего один раз. Но происходит он с достаточно большой скоростью и очень селективно, строго по определенным точкам, разделяющим интрон от двух смысловых участков предшественника. Иными словами, процесс несет на себе все основные черты ферментативного процесса. Таким образом родилось представление, что РНК-предшественник является ферментом, образованным молекулой РНК. Далее было установлено большое число аналогичных фактов и был введен термин *рибозим*, т.е. фермент (энзим), построенный из молекулы РНК.

Процесс, катализируемый рибозимом этого типа, можно представить в виде следующей брутто-схемы:

$$\ldots \text{pX}_{i-1}\text{pX}_i\text{pY}_1\text{pY}_2 \ldots \text{pY}_m\text{pX}_{i+1}\text{pX}_{i+2} \ldots + \text{G} \rightarrow \ldots \text{pX}_{i-1}\text{pX}_i\text{pX}_{i+1}\text{X}_{i+2} \ldots +$$
$$+ \text{GpY}_1\text{pY}_2 \ldots \text{pY}_m, \qquad (\text{VI.3})$$

где X — нуклеозидные остатки, входящие в состав экзона; Y — остатки в составе интрона (номера обозначают положение соответствующего нуклеозида в цепи); m – число нуклеотидных остатков в интроне.

Согласно этой схеме, в процессе в качестве кофактора участвует гуанозин. На первой стадии сплайсинга он присоединяется фосфоэфирной связью к 5′-фосфа-

ту первого нуклеотидного остатка интрона. Одновременно происходит разрыв фосфодиэфирной связи между этим фосфатом и 3′-концом левого экзона:

$$\ldots pX_{i-1}pX_ipY_1pY_2 \ldots pY_mpX_{i+1}pX_{i+2} \ldots + G \rightarrow \ldots pX_{i-1}pX_i + GpY_1pY_2 \ldots pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}. \quad (VI.4)$$

Однако левый экзон, даже не будучи связан ковалентно с остальной частью предшественника, остается вблизи этой части и участвует во второй стадии, также представляющей собой реакцию переэтерификации. При этом образуется связь между 3′-концом левого экзона и 5′-концом правого. В итоге интрон выщепляется в виде производного, содержащего дополнительный остаток гуанозина на 5′-конце, согласно уравнению

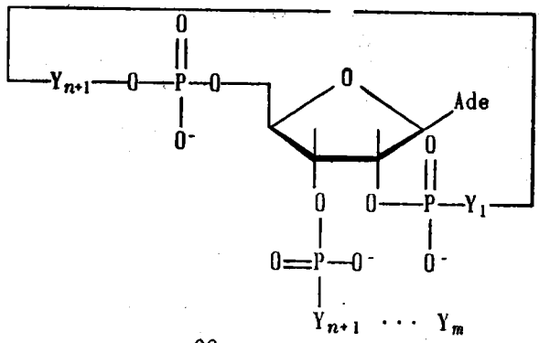
$$\begin{array}{l} \ldots pX_{i-1}pX_i + pX_{i+1}pX_{i+2}\ldots \qquad \ldots pX_{i-1}pX_ipX_{i+1}pX_{i+2}\ldots \\ \quad\quad | \qquad\qquad\qquad\qquad \longrightarrow \\ GpY_1pY_2\ldots pY_m \qquad\qquad + GpY_1pY_2\ldots pY_m. \end{array} \quad (VI.5)$$

Второй тип вырезания интронов был обнаружен при изучении сплайсинга митохондриальных пре-мРНК. В этом случае сплайсинг начинается с внутримолекулярной атаки 2′-ОН-группы одного из внутренних остатков аденозина на 5′-концевой фосфат интрона. Возникает структура, в которой этот внутренний аденозин связан тремя фосфодиэфирными связями с участием всех его ОН-групп с соседями слева и справа и с концевым фосфатом интрона. После этого происходит соединение экзонов и выщепление интрона в виде структуры типа «лассо» (lariat) (98):

$$\ldots pX_{i-1}pX_ipY_1pY_2\ldots pA\ldots pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}\ldots \rightarrow \ldots pX_{i-1}pX_i + \overset{5'\rightarrow 2'}{\overbrace{pY_1pY_2\ldots pA}}\ldots pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}\ldots \rightarrow$$

$$\rightarrow \ldots pX_{i-1}pX_ipX_{i+1}pX_{i+2}\ldots + \overset{5'\rightarrow 2'}{\overbrace{pY_1pY_2\ldots pA}}\ldots pY_m \quad (VI.6)$$

Эту структуру можно представить в виде



98

Второй источник каталитически активных РНК — вироиды и вирусоиды. И те, и другие являются инфекционными молекулами РНК. Вироиды состоят примерно из 300 нуклеотидов и поражают некоторые растения. Их РНК не кодирует какие-либо белки, и механизм их патогенного действия еще не установлен. Одно из выдвигаемых объяснений состоит в том, что они образуют дуплексные структуры с определенными функционально значимыми РНК, парализуя их действие. Вирусоиды также представляют собой близкие по размеру к вироидам молекулы РНК, но в отличие от вироидов они могут размножаться лишь при одновременном заражении клетки вирусом-помощником. Для некоторых из них было установлено, что во время репликации внутри клетки они образуют цепи, состоящие из нескольких молекул РНК, и, следовательно, должны быть расщеплены по определенным точкам. Вероятно, это связано с тем, что их репликация происходит по механизму катящегося кольца, описанному для некоторых фагов, содержащих однонитевую ДНК. В инфекционные частицы они превращаются после саморасщепления по точкам, соединяющим две последовательности. В этом случае опять-таки речь идет об очень специфичном процессе, поскольку расщепление происходит в строго определенной точке полирибонуклеотидной цепи. Сравнительное изучение структур ряда вироидов и вирусоидов привело к заключению, что все они в области саморасщепления обладают определенной вторичной структурой, которая получила название структуры типа головки молотка (hammerhead). Пример такой структуры представлен на рис. 67 для вирусоида, сопутствующего вирусу преходящей полосатости люцерны.Такая структура может быть синтезирована искусственно либо методами рибоолигонуклеотидного синтеза, либо путем транскрипции соответствующего синтезированного фрагмента двунитевой ДНК с помощью РНК-полимеразы. Это позволяет вносить во фрагмент природной структуры многочисленные изменения. В частности, исследования показали, что эта структура может быть разделена на каталитическую часть и субстрат. Если эти две части получить в виде отдельных рибоолигонуклеотидов, то при их объединении происходит такой же гидролитический процесс, как и в полной структуре. Однако при этом один рибозим может последовательно расщепить большое число молекул субстрата. В этом случае расщепление происходит по схеме, характерной для панкреатической РНКазы с образованием 2′,3′-циклофосфата и 5′-ОН-группы. Кинетика процесса описывается классическим уравнением Михаэлиса с константой Михаэлиса K_M = 1,3 μM и каталитической константой 0,5 мин$^{-1}$. Последняя величина довольно мала по сравнению с характер-

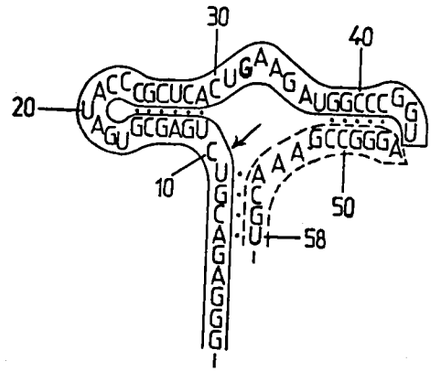


Рис. 67. Структура типа головки молотка (*hammerhead*) для вирусоида, сопутствующего вирусу преходящей полосатости люцерны (vLTSV–*virusoid of the lucerne transient streak verus*). Сплошной линией выделена субстративная часть, прерывистой – рибозим. Место расщепления указано стрелкой

ными для ферментов белковой природы, но на несколько порядков выше, чем в случае чисто химического гидролиза при тех же условиях.

Открытие рибозимов стимулировало исследования с целью выяснения возможности катализировать реакции другого типа с помощью РНК-катализаторов. Так как структурные мотивы, обладающие каталитическими свойствами, оказались довольно разнообразными, был применен получивший чрезвычайно широкое распространение в последние годы метод селекции *in vitro* (см. § 7.12).

Следует отметить, что открытие рибозимов вызвало серьезный интерес у ученых, занятых вопросами происхождения жизни. До открытия рибозимов, когда преобладала точка зрения, что катализаторами могут быть только белки, все время возникал вопрос: кто же появился раньше — нуклеиновые кислоты, которые необходимы для передачи из поколения в поколение информации, или белки, которые должны катализировать различные превращения, в том числе и реакции синтеза новых молекул нуклеиновых кислот, необходимых для сохранения и реализации информации? С открытием рибозимов появилась возможность спекулировать, что жизнь началась с нуклеиновых кислот, которые наряду с информационной функцией могли служить и катализаторами некоторого набора биохимических процессов. Белки могли появиться на более поздних этапах эволюции.

6.5. ДИНАМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ

Из предыдущих параграфов этой главы можно видеть, что учение о молекулярных основах действия ферментов — молекулярная энзимология — в XX в. прошло большой путь. Первым выдающимся достижением, сегодня представляющимся банальным, является осознание того факта, что ферменты осуществляют свое каталитическое действие только находясь в прямом контакте с субстратами. Образование комплекса фермент — субстрат (один или несколько) является первой стадией ферментативного катализа. На этом положении основано все кинетическое рассмотрение ферментативных реакций. В самом простом варианте, когда за образованием комплекса непосредственно следует превращение, причем оно рассматривается как необратимое и является лимитирующей стадией всего процесса, квазистационарная кинетика описывается уравнением Михаэлиса — Ментен. Понятия о максимальной скорости и константе Михаэлиса являются фундаментальными в современной энзимологии. На этом же постулате основано рассмотрение более сложных ферментативных реакций и разработана методология составления схем таких реакций и вывода кинетических уравнений. На основе этого же постулата разработаны подходы к выводу более сложных уравнений, описывающих начальную фазу ферментативной реакции, до того, как установился квазистационарный режим, описываемый уравнением Михаэлиса—Ментен (предстационарный режим).

Второе важнейшее положение, вытекающее из всего опыта энзимологии, состоит в том, что ферменты используют только хорошо известные в химическом учении о катализе типы каталитических механизмов. В простейшем случае это может быть просто кислотно-основный катализ, осуществляемый с помощью нескольких кислотных или основных групп белка-фермента. Классическим примером является катализ расщепления полирибонуклеотидной цепи с помощью панкреатической РНКазы (см. § 6.1). Большая группа ферментов, в первую очередь так называемых сериновых протеаз, в которую входят трипсин, химотрипсин, эластаза и многие другие ферменты, работают по механизму нуклеофильного катализа. В знаменитой триаде аспартат—гистидин—серин протон OH-группы серина в активном центре фермента оттянут. Это облегчает нуклеофильную атаку карбонильной группы на гидроксигруппу серина с разрывом пептидной связи, образуемой этой карбонильной группой в субстрате. Следует отметить, что при этом амидная группа разрываемой пептидной связи должна превратиться в аминогруппу, что может быть облегчено подачей протона от какой-либо кислотной группы фермента, т.е. нуклеофильный катализ может сопровождаться кислотным катализом. Ферменты могут осуществлять также электрофильный и окислительно-восстановительный катализ. В этом случае, однако, необходимо привлечение специальных кофакторов. В случае электрофильного катализа таковым может быть ион металла. Классическим примером является фермент карбоксипептидаза, который катализирует гидролиз C-концевой пептидной связи. Центральную роль играет атом Zn^{2+}, который координирован двумя имидазольными кольцами гистидинов и карбоксильной группой глутамата, сохраняя при этом один положительный заряд. Окислительно-восстановительный катализ осуществляется ферментами, использующими в качестве кофактора сложные органические молекулы, способные переносить электроны, например флавиновые нуклеотиды.

Роль белка или белковой части фермента (апофермента) состоит помимо прямого участия в катализе в связывании в определенном участке кофактора и в связывании субстрата или субстратов с определенной ориентацией их относительно каталитически активных групп. При этом осуществляется отбор строго определенных субстратов из множества сходных молекул, в принципе способных к таким же реакциям. Например, специфичность карбоксипептидаз именно к C-концевым остаткам в значительной мере обусловлена тем, что в связывании и ориентации относительно атома цикла принимают участие положительно заряженные остатки аргинина, которые взаимодействуют с концевой карбоксильной группой гидролизуемого пептида.

К настоящему времени накоплен огромный материал по структуре комплексов фермент — субстрат. Роль отдельных групп в отборе субстрата или в каталитическом акте, гипотетически вытекающая из этих структур, сегодня во многих случаях подтверждается сайт-направленным мутагенезом, одним из важнейших методов выявления роли отдельных аминокислотных остатков в функционировании белка (см. § 7.11). Это позволяет заменить определенный аминокислотный остаток, предположительно участвующий в узнавании или в каталитическом акте, на любой другой путем создания соответствующей мутации в гене, программирующем исследуемый фермент или апофермент. Сохранение или, наоборот, исчезновение каталитических свойств является доводом в пользу или против роли данного остатка в каталитическом процессе. Однако сегодня установлены структуры ничтожно малой части ферментов и апоферментов и можно думать, что дальнейшее накопление материала по этому вопросу послужит основой для новых интересных обобщений.

В то же время, как уже вкратце отмечалось в § 6.1, рассмотрение механизма узнавания исходит из статической картины взаимодействия фермент—субстрат. Между тем накопилось немало вопросов, получение ответов на которые на молекулярном уровне требует динамического рассмотрения. Скорее всего именно в эту область постепенно перемещаются главные проблемы молекулярной энзимологии.

Некоторые из таких вопросов уже вкратце упоминались. Это, во-первых, нап-

равленные конформационные переходы, сопровождающие образование комплекса фермент—субстрат, постулированные Кошландом и наблюдаемые экспериментально в отдельных случаях. Во-вторых, это вопросы аллостерической регуляции (см. § 6.3). Аллостерический ингибитор, по-видимому, вызывает направленный конформационный переход, приводящий к нарушению структуры активного центра фермента и тем самым к его частичной или полной инактивации. В-третьих, это процесс транслокации, т.е. направленного перемещения матрицы и синтезируемого белка или нуклеиновой кислоты на каждом звене элонгации матричного биосинтеза (см. § 5.3). К этому можно добавить некоторые другие проблемы.

Как уже говорилось, ферментативная реакция складывается из узнавания субстрата или субстратов с их размещением должным образом относительно активного центра фермента и самого акта катализа. Долгое время существовало представление, что узнавание, т.е. сродство субстрата к ферменту, может характеризоваться константой Михаэлиса, которая приближенно равна константе диссоциации комплекса фермент—субстрат, во всяком случае если величина $k_{кат}$ имеет тот же порядок или меньше, чем величина k_{-1} [см. уравнение (6.6)]. Это представление, качественно не подвергающееся сомнению, оказалось недостаточным, когда началось систематическое количественное рассмотрение вопроса о специфичности ферментов.

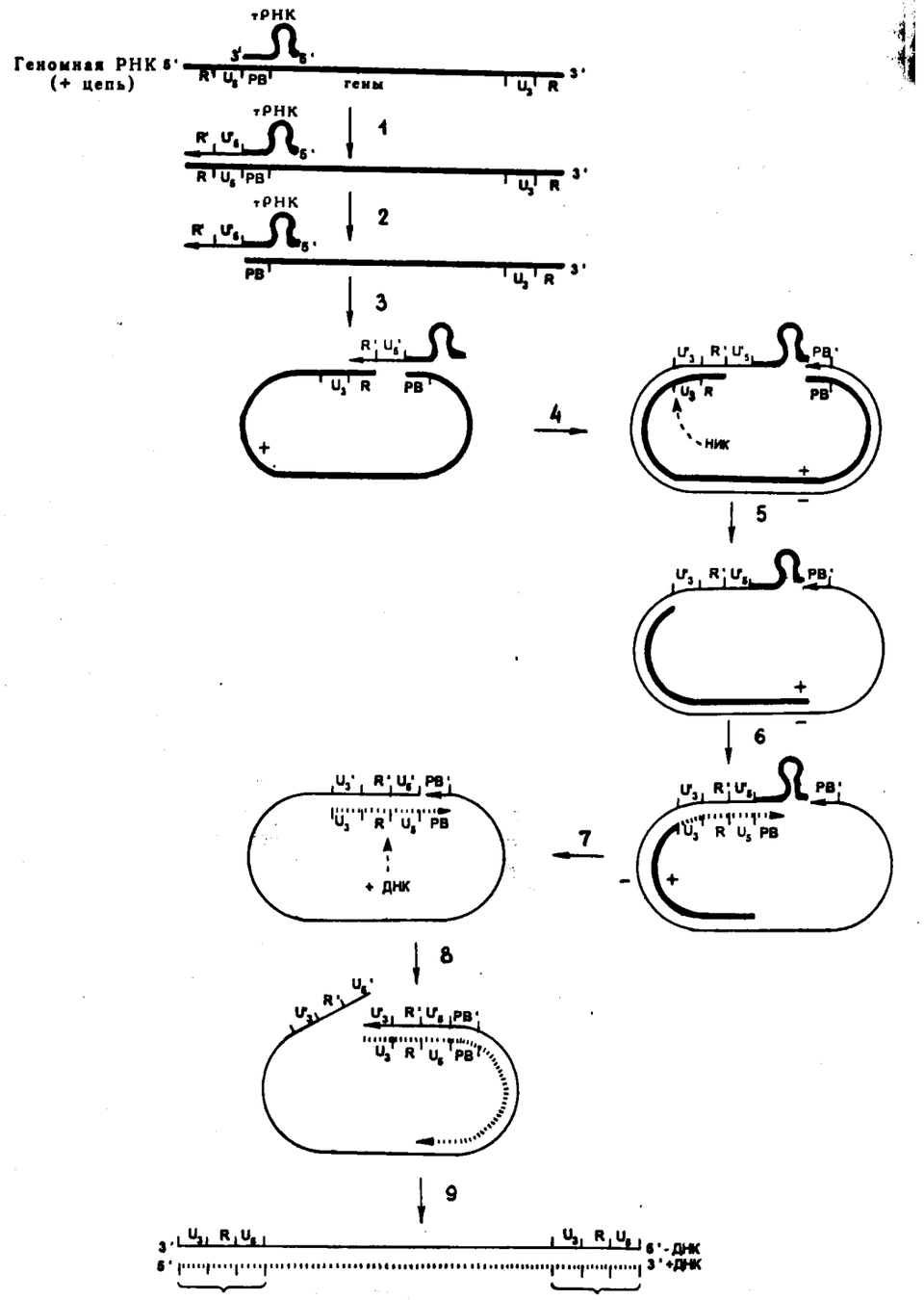
Эта проблема особенно остро встает в ситуациях, когда в живом организме присутствует несколько схожих по структуре субстратов. Впервые эта проблема возникла при рассмотрении вопроса о специфичности реакций, катализируемых аминоацил-тРНК-синтетазами (см. § 4.6). Все транспортные РНК имеют сходную пространственную структуру, и в ряде случаев аминоацил-тРНК-синтетаза может катализировать, хотя и с очень небольшой скоростью, ацилирование соответствующей ей аминокислотой не соответствующую ей тРНК, т.е. происходит ошибочное аминоацилирование тРНК. Казалось бы, дискриминация разных тРНК должна происходить на стадии узнавания, т.е. на стадии образования комплекса фермент—тРНК. Однако оказалось, что при специфичном и неспецифичном аминоацилировании для разных тРНК отличаются не константы Михаэлиса, характеризующие стадию узнавания, а главным образом максимальные скорости процесса, т.е. кинетические константы процесса. В качестве еще одного примера можно привести фермент урацил-ДНК-гликозилазу, (см. § 5.1). Этот фермент катализирует выщепление остатка урацила из ДНК. Следовательно, фермент должен четко дискриминировать остатки дТМФ и дУМФ в составе ДНК. Казалось бы, фермент должен узнавать те ДНК, в которых присутствует урацил. Однако исследования, проведенные с ферментом из плаценты человека, показали, что сродство дуплекса, состоящего из $p(dA)_{15}$ и $p(dT)_{15}$, измеряется константой диссоциации $6{,}5 \cdot 10^{-5}$ М, а в том случае, если во втором партнере вставлен один остаток $pdUp(dT)_7pdUp(dT)_7$, сродство изменяется всего на порядок, составляя $7 \cdot 10^{-6}$ М. Узнавание поврежденного участка оказывается недостаточным для высокоизбирательного выщепления урацила.

Эти и ряд других примеров заставляют предположить, что за актом узнавания, но перед каталитическим актом происходит некоторая более тонкая взаимная подстройка субстрата с активным центром. Иными словами, ферментативный процесс в таких случаях состоит из трех этапов: узнавания с образованием комплекса фермент—субстрат, тонкой подстройки субстрата к набору каталитических групп и самого акта катализа. Нетрудно заметить, что такая подстройка является событием динамическим и выявление механизма этого процесса требует использования методов молекулярной динамики, о которых будет сказано в § 7.15.

Второе явление, происходящее на уровне единичного фермента, состоит в изменении по ходу функционирования фермента на определенных этапах типа его активности. Это, естественно, присуще тем ферментам, которые потенциально обладают несколькими разнотипными активностями. Очень интересным и важным в практическом отношении является обратная транскриптаза, огромный интерес к которой связан с тем, что она входит в состав вируса ВИЧ-1, вызывающего СПИД. Рассмотрим схематично механизм работы этого фермента.

Вирус ВИЧ в составе зрелой внеклеточной частицы содержит геномную молекулу РНК. Однако развитие вирусной инфекции связано с этой РНК лишь в самой начальной фазе. По информации, содержащейся в этой РНК, воспроизводится молекула ДНК, сначала однонитевая. Затем на ней, как на матрице, воспроизводится комплементарная цепь и образующаяся двунитевая ДНК встраивается в геном инфицированной клетки. Именно эта ДНК далее управляет синтезом копий мРНК, необходимых для программирования синтеза вирусных белков, и самой РНК вириона, которая должна входить в состав новых вирусных частиц. Исходная же РНК при синтезе ДНК постепенно уничтожается с помощью активности, известной под названием РНКазы Н. Этот фермент катализирует гидролитическое расщепление РНК в составе гибридного дуплекса РНК·ДНК. Таким образом, для формирования двунитевой ДНК копии геномной РНК вируса ВИЧ-1 необходимо проявление трех активностей: обратной транскрипции для синтеза однонитевой ДНК, ДНК-полимеразной активности для получения двунитевой ДНК и, наконец, активности РНКазы Н. Оказывается, все эти активности присущи самой обратной транскриптазе вируса ВИЧ-1. Однако самое удивительное состоит в том, что переключение активностей происходит строго упорядоченно, это не просто три параллельно работающих активных центра на одном ферменте. Последовательность происходящих событий представлена на рис. 68. Рассмотрим ее более подробно.

Как всякая ДНК-полимераза, обратная транскриптаза может осуществлять лишь реакцию элонгации; для включения ее в работу нужен праймер. Роль праймера в зараженной клетке играют для ретровирусов определенные тРНК, в данном случае лизиновая тРНК. Ее 3′-концевой фрагмент комплементарен определенному участку геномной РНК, который называют праймер-связывающим участком (PB). Он находится вблизи 5′-конца геномной РНК, соседствуя с участком, обозначаемым как U_5, за которым следует находящийся на 5′-конце на участок R, идентичный участку, находящемуся на 3′-конце геномной РНК. Так что на первом этапе происходит обратная транскрипция всего-навсего небольшого кусочка РНК-овой последовательности и процесс на этом мог бы просто оборваться, остался бы прочный дуплексный участок на 5′-конце геномной РНК. Этого, однако, не происходит, так как в работу включается Н-РНКазная активность. Прочитанная информация в виде фрагмента R—U_5 уничтожается, и возникает ДНК-фрагмент, комплементарный уничтоженному фрагменту R—U_5, который обозначают как R′—U_5'. Затем на ферменте происходит новый пируэт — R′ перескакивает на имеющийся на противоположном конце геномной РНК комплементарный ему участок R, образуя праймер для продолжения работы обратной транскриптазы. Последняя получает теперь возможность провести обратную транскрипцию



всей оставшейся части геномной РНК, в том числе, вытеснив тРНК, переписать в виде ДНК участок ВР связывания праймера. Так как эта ДНК является комплементарной копией геномной плюс-РНК, то она должна рассматриваться как минус-ДНК. Получается полная ДНК-реплика геномной РНК вируса с тРНК на 5′-конце. Информация с геномной ДНК уже считана. Но для получения второй нити ДНК (плюс-ДНК, с той же последовательностью, что и геномная РНК) все еще нужен праймер. Он создается специфичным разрывом оставшейся части РНК в участке, предшествующем фрагменту U_3, который находился на ее 3′-конце перед R. В результате этого формирование плюс-ДНК начинается с воссоздания участка U_3—R—U_5—PB. На этом использование РНК заканчивается, РНКазы H завершает работу по ее деградации и фермент целиком переключается на работу в режиме ДНК-полимеразы. Начавшая синтезироваться плюс-цепь зацепляется освободившимся участком PB за 3′-конец минус-ДНК. Это дает возможность последней продолжить элонгацию до полного считывания 5′-конца начавшей формироваться плюс-цепи. Одновременно плюс-цепь получает возможность элонгироваться до достижения 5′-конца минус-цепи. Как видно из схемы, при этом на обоих концах линейной двунитевой ДНК возникают идентичные структуры, известные как длинные концевые повторы (long terminal repeats, LTR), с помощью которых происходит встраивание вирусной ДНК в геном.

Из приведенной достаточно сложной схемы видно, что на протяжении функционирования происходят нетривиальные события. Так, на первой фазе идет образование гибридного дуплекса участка R—U_5. Если бы в момент обратной транскрипции участка R—U_5 в работу одновременно включилась активность РНКазы H, мог бы деградировать еще не прочитанный участок геномной РНК и процесс был бы нарушен. Разрешение на включение РНКазы H должно даваться только по завершении обратной транскрипции на 5′-конце геномной РНК. Нетривиальным событием является скачок, совершаемый геномной РНК после освобождения фрагмента ДНК от РНК. Важным и нетривиальным событием является последующий разрыв геномной РНК в определенной точке перед фрагментом U_3, чем задается структура длинного концевого повтора. Опять-таки нетрудно заметить, что вопрос о переключении активностей в пределах одного работающего фермента также требует рассмотрения с позиций молекулярной динамики.

Таким образом, несмотря на большие успехи молекулярной энзимологии в изучении структуры комплексов фермент—субстрат, перед этой областью биохимии стоят новые, еще более сложные задачи, без решения которых ни понимание молекулярного механизма работы ферментов, ни принципы конструирования искусственных ферментов не будут достаточно полными.

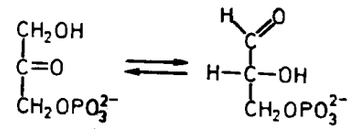
Рис. 68. Работа обратной транскриптазы на примере фермента из вируса ВИЧ-1, вызывающего СПИД:

1 – синтез минус-цепи ДНК, содержащий в качестве праймера тРНК; *2* – гидролиз РНКазой H-участка плюс-цепи РНК, содержащего R и U_5; *3* – первый скачок. Образование дуплекса 3′-конца плюс-цепи РНК и R′-фрагмента вновь синтезированной минус-цепи ДНК и начало синтеза минус-цепи ДНК; *4* – элонгация синтеза минус-цепи ДНК; *5* – образование ника в РНК в точке, предшествующей участку U_5; *6* – синтез плюс-цепи ДНК и образование U_3, R, U_5, PB области, комплементарной U_3', R′, U_5'; *7* – расщепление тРНК-фрагмента минус-цепи РНКазой H; *8* – завершение синтеза плюс-цепи ДНК; *9* – завершение синтеза двухцепочечной ДНК

Задачи

6.1. В активном центре лактатдегидрогеназы обнаружены следующие аминокислотные остатки, участвующие в связывании пирувата: Arg-171, His-195, Asp-168 и Arg-109. Изобразите гипотетическую модель взаимодействия пирувата с этими остатками и вытекающий из этой модели механизм переноса гидрид-иона.

6.2. Триозофосфатизомераза катализирует реакцию изомеризации между дигидроксиацетонфосфатом и D-глицеральдегидфосфатом:



Известно, что фермент работает без участия кофакторов и без образования промежуточных продуктов. Какие аминокислотные остатки могут участвовать в формировании активного центра фермента? Предложите гипотетическую модель активного центра.

6.3. Обратная транскриптаза вируса птичьего миелобластоза катализирует синтез нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), используя в качестве матрицы РНК. За скоростью реакции полимеризации следят по включению радиоактивного нуклеотида. Исходя из данных, представленных в таблице (число импульсов в минуту в пробах, отбираемых через определенное время), определите кинетические параметры K_M и V_{max} для ундекануклеотида $(pdT)_{10}pdC$, используемого в качестве затравки на поли (A) матрице. Удельная активность ppp — [^{3}H]T составляет $9 \cdot 10^{13}$ тБк/моль, эффективность счета — 30%, объем проб — 10 мкл.

Время, мин	Число импульсов в минуту при концентрации (моль/л) $(pdT)_{10}pdC$				
	$1{,}05 \cdot 10^{-8}$	$2{,}1 \cdot 10^{-8}$	$4{,}2 \cdot 10^{-8}$	$6{,}3 \cdot 10^{-8}$	$8{,}4 \cdot 10^{-8}$
1	13 383	19 783	25 478	23 807	26 816
2	24 943	38 056	42 748	52 221	57 190
3	35 662	59 179	65 048	79 085	86 223
4	49 964	70 630	97 016	109 354	114 023
5	59 497	93 061	116 614	125 468	145 278

6.4. Панкреатическая рибонуклеаза катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей РНК по двустадийному механизму с образованием промежуточного соединения — циклического-2′,3′-фосфата [см. уравнение (VI.1)].

Для исследования ингибирования рибонуклеазы дезоксидинуклеотидом d(pTpA) в качестве субстрата использовали 2′, 3′-цикло-CMP.

При гидролизе циклофосфата до 3′-CMP наблюдается изменение поглощения при 292 нм ΔA_{292}, что позволяет следить за гидролизом спектрофотометрическим методом. Из данных, представленных в таблице, определите K_M для 2′,3′-цикло-CMP, K_i для d(pTpA) и тип ингибирования.

Концентрация cCMP, моль/л	Концентрация d(pTpA), моль/л	Начальная скорость гидролиза, ΔA_{292}/мин	Концентрация cCMP, моль/л	Концентрация d(pTpA), моль/л	Начальная скорость гидролиза, ΔA_{292}/мин
$5 \cdot 10^{-4}$	0	$3{,}4 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-4}$	0	$4{,}2 \cdot 10^{-2}$
	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$2{,}9 \cdot 10^{-2}$		$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$3{,}9 \cdot 10^{-2}$
	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$2{,}7 \cdot 10^{-2}$		$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3{,}3 \cdot 10^{-2}$
$6 \cdot 10^{-4}$	0	$3{,}8 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-4}$	0	$4{,}4 \cdot 10^{-2}$
	$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$3{,}5 \cdot 10^{-2}$		$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$4{,}0 \cdot 10^{-2}$
	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3{,}0 \cdot 10^{-2}$		$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3{,}6 \cdot 10^{-2}$
			$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	0	$4{,}8 \cdot 10^{-2}$
				$1{,}1 \cdot 10^{-4}$	$4{,}4 \cdot 10^{-2}$
				$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$4{,}0 \cdot 10^{-2}$

6.5. В ряде случаев кинетические исследования ферментативных реакций удобно проводить в условиях избытка фермента по отношению к субстрату, т.е. $[E]_t \gg s$. Выведите для этого случая уравнение Михаэлиса — Ментен для текущей и начальной скоростей.

6.6. Двусубстратная реакция протекает с участием двух сильно различающихся по своей структуре субстратов. Как можно определить порядок присоединения субстратов к ферменту, используя поочередно не способные к превращению структурные аналоги одного и другого субстрата? Выведите соответствующие уравнения в предположении о квазиравновесии всех участвующих в процессе комплексов.

6.7. Используя значения pK' для участвующих в катализе остатков гистидина, определите, при каком значении pH V_{max} для панкреатической рибонуклеазы достигает максимального значения и в каком интервале значений pH V_{max} уменьшается не больше чем на 10% от максимального значения.

ГЛАВА 7

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Биохимия является одновременно и биологической, и химической дисциплиной. Биологической она является в первую очередь по природе изучаемых ею объектов, которые представлены веществами животного, растительного и микробного происхождения. Биологической она является и по тем конечным целям, во имя которых проводятся биохимические исследования — познание свойств и выяснение механизмов функционирования веществ, из которых построена живая материя. В то же время, будучи наукой о веществах и о протекающих с их участием химических превращениях, биохимия по своей методологии является химической дисциплиной. Она использует разнообразные методы, которые предоставляют в ее распоряжение фундаментальные химические науки — неорганическая, органическая, аналитическая и физическая химия, а также химия высокомолекулярных соединений. В то же время природа исследуемых объектов, особенности решаемых задач накладывают свою специфику на использование этих методов, на их относительную значимость. Наиболее выпукло эти особенности проявляются при исследовании нерегулярно построенных биологических полимеров — белков и нуклеиновых кислот, которые являются более высокой формой организации материи, чем низкомолекулярные соединения и регулярно построенные гомополимеры, также широко представленные в живой природе, в первую очередь различными полисахаридами.

Становление биохимии как основополагающей биологической дисциплины началось с исследования веществ, существующих в живой природе, и химических процессов, происходящих в живых организмах. Поэтому среди методов, используемых в биохимии, ключевое значение имеют выделение веществ из биологических источников и, как правило, их очистка с целью получения индивидуальных соединений.

Следует отметить три главные проблемы выделения в индивидуальном виде компонентов из живых организмов, в особенности наиболее сложных компонентов — белков и нуклеиновых кислот. В значительной мере это касается и получения искусственных белков и нуклеиновых кислот, которое стало возможным в последние десятилетия.

Во-первых, исходный материал — биомасса, из которой предстоит выделить интересующее исследователя вещество,— состоит из многих сотен или даже тысяч различных соединений. Разделение таких смесей по уровню сложности не имеет себе равных среди других химических дисциплин. Это дополнительно усугубляется тем, что многие компоненты этих смесей, выполняя различные биологические функции, построены довольно однотипно. Например, смесь иммуноглобулинов в сыворотке крови представлена набором огромного числа белков различной специфичности, но они мало отличаются между собой по аминокислотному составу. В связи с этим они мало различаются между собой и по таким физико-химическим характеристикам, как растворимость или способность поглощаться определенным типом сорбентов, и поэтому для их разделения не могут быть использованы классические методы — осаждение, экстракция, адсорбция на традиционных сорбентах. То же можно сказать и о разделении смесей информационных РНК, которые могут быть представлены в используемом биологическом материале сотнями различных по структуре, но близких по своему нуклеотидному составу молекул.

Во-вторых, работа с биохимическими объектами, которая касается не только методов выделения и очистки, но и многочисленных исследовательских работ с ними, особенно с белками и нуклеиновыми кислотами, заключается в необходимости манипулировать с очень маленькими количествами вещества — миллиграммами, микрограммами и даже значительно меньшими. При выделении это связано с незначительным содержанием многих компонентов в исходной биомассе, а также в ряде случаев с ограниченным количеством биомассы, например при исследовании редко встречающегося животного или растения или очень мелких живых объектов, которые иногда добываются поштучно и доступны в небольшом числе.

Как при выделении, так и в ходе различных исследовательских процедур необходимо осуществлять детекцию выделяемых или исследуемых веществ. При ничтожно малом количестве материала используемые для детекции методы должны быть высокочувствительными. Поэтому в биохимии редко используются такие классические приемы аналитической химии, как гравиметрический или объемный анализ. Основными методами детекции являются спектрофотометрические методы, основанные на измерении поглощения видимого или ультрафиолетового света, радиохимические методы, основанные на измерении радиоактивности, и люминесцентные методы, основанные на измерении флуоресценции, био- и хемилюминесценции.

В-третьих, многие компоненты обладают очень низкой устойчивостью. Часто задача состоит в том, чтобы выделить тот или иной биополимер в нативном, т.е. сохраняющем биологическую активность, состоянии. Между тем многие белки и высокополимерные нуклеиновые кислоты при умеренных температурах и незначительных изменениях pH среды подвержены необратимому изменению конформации — денатурации, которая обычно сопровождается потерей биологической активности — инактивацией. Кроме того, в клетках часто находятся ферменты, способные разрушать те или иные вещества. В первую очередь это относится к белкам и нуклеиновым кислотам, так как клетки обычно содержат ферменты, способные катализировать гидролиз этих биополимеров, — протеазы и нуклеазы. В неповрежденных клетках эти ферменты преимущественно сосредоточены в специальных гранулах — лизосомах. Однако при разрушении клеток или тканей, которое всегда предшествует началу работ по выделению интересующих исследователя веществ, лизосомы обычно разрушаются, ферменты выходят наружу, что приводит к быстрому разрушению биополимеров уже в исходной биомассе.

Наряду с применением классических химических методов развитие биохимии

открыло принципиально новые возможности для проведения экспериментальных исследований. При определении первичной структуры белков и нуклеиновых кислот (см. § 7.7 и 7.8) необходимо расщепление исходных молекул на фрагменты меньшего размера, причем для получения гомогенных фрагментов нужно провести расщепление по строго определенным точкам. Это в основном достигнуто в случае белков вследствие применения специальных протеаз, таких, как трипсин, химотрипсин, эластаза, а в случае нуклеиновых кислот — с помощью специальных эндонуклеаз-рестрикции. Химический синтез генов позволяет достигнуть полинуклеотидов длиной в несколько десятков или одной-двух сотен нуклеотидных остатков. Получение более длинных цепей оказалось возможным вследствие соединения синтетических фрагментов в помощью фермента ДНК-лигазы (см. § 5.4). Синтез больших молекул РНК стал возможным при использовании транскрипции синтетических генов с помощью РНК-полимераз, среди которых особенно эффективными для этой цели оказались РНК-полимеразы бактериофагов T7 и SP6.

Но особенно революционизирующее влияние на экспериментальные возможности биохимии оказало применение ферментов матричного биосинтеза, в первую очередь ДНК-полимераз. Аналитические возможности в биохимии нуклеиновых кислот неизмеримо возросли с появлением амплификации, т.е. размножения молекул ДНК с определенной последовательностью нуклеотидов с помощью ДНК-полимеразы. Применение прямой и обратной транскрипции позволило перенести многие методы, разработанные применительно к ДНК, на рибонуклеиновые кислоты (см. § 7.6).

Способность живых организмов и самих молекул ДНК к размножению открыла широкую дорогу селекционным методам для решения биохимических задач. Возможность вырезания из ДНК определенных генов, получения их путем обратной транскрипции матричных РНК и разработка методов искусственного химико-ферментативного синтеза генов позволили манипулировать генами, в том числе вставлять их в плазмиды или вирусы, а затем вносить их в микроорганизмы для последующего размножения. Микробиологические методы позволили разработать методы селекции тех популяций микроорганизмов (клонов), которые выросли из отдельных клеток, несущих желаемые признаки, например способных продуцировать определенные белки, не свойственные этим организмам. Так родилась генная инженерия, которая не только открыла новые горизонты в биотехнологии, но и стала важнейшим инструментом биохимических исследований.

Наконец, селекция ДНК или РНК из искусственно созданной смеси огромного числа различных молекул нуклеиновых кислот с последующим размножением отобранных ДНК путем амплификации открыла путь к созданию нуклеиновых кислот с самыми разнообразными заданными свойствами. Все эти новые подходы также будут описаны в соответствующих параграфах этой главы.

При рассмотрении классических методов основной акцент делается на те из них, которые находят существенно меньшее применение при изучении объектов неживой природы и низкомолекулярных соединений. Методы, широко используемые фундаментальными химическими дисциплинами и поэтому подробно разбираемые в соответствующих химических курсах, упоминаются лишь вкратце с акцентом на специфику их использования применительно к живым объектам. Основное же внимание в этой главе уделено специальным методам, порожденным самим развитием биохимии и тем модификациям физических методов исследования структуры, которые сделали возможным применять самые могучие инструменты структурной химии, такие, как рентгеноструктурный анализ и двумерная ЯМР-спектроскопия, к сложнейшим биохимическим объектам, каковыми являются белки и нуклеиновые кислоты.

7.1. ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОПОЛИМЕРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ФИЗИЧЕСКОЙ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

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. Наиболее производительные процедуры разделения основаны на различном распределении веществ между двумя фазами. Любая такая процедура приводит к разделению исходной смеси на две части (фракции), в одну из которых преимущественно или полностью переходит выделяемый компонент. Ввиду исключительной сложности смесей, с которыми имеют дело биохимики, на первых этапах разделения в подавляющем большинстве случаев фракция, содержащая выделяемое вещество, содержит множество других компонентов, т.е. происходит лишь частичная очистка (обогащение смеси искомым компонентом).

Выделение индивидуальных биополимеров является поэтому многоступенчатым процессом. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая выделяемым веществом, чем на предыдущей ступени, и содержащая меньшее число побочных компонентов. Такой процесс часто называют *фракционированием*.

На каждой стадии разделения, включая и начальную, биополимер находится либо в виде раствора, либо в виде осадка. Говоря о разделении биополимеров, можно сразу же исключить из рассмотрения все методы, при которых одна из фаз, между которыми происходит распределение, является газовой. Биополимеры в ощутимых количествах в газовой фазе не существуют.

Для выделения искомого биополимера из раствора можно воспользоваться осаждением, для чего необходимо понизить растворимость этого биополимера.

Растворимость биополимеров в воде в значительной мере определяется их способностью к гидратации. У глобулярных водорастворимых белков высокий уровень гидратации обеспечивается предпочтительным расположением на их поверхности гидрофильных групп. У нуклеиновых кислот важным фактором, способствующим гидратации, является наличие в нейтральной и щелочной среде отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты. Добавление органических растворителей понижает степень гидратации и приводит к осаждению гидрофильных биополимеров. Так, для осаждения белков используется добавление к их водным растворам ацетона. Нуклеиновые кислоты осаждаются добавлением этанола.

Роль электрического заряда в обеспечении растворимости биополимеров не исчерпывается формированием гидратных оболочек. Электростатическое отталкивание между ионными атмосферами, образуемыми противоионами, препятствует сближению этих молекул до критического расстояния, на котором это отталкивание уравновешивается силами ван-дер-ваальсова притяжения и становится воз-

можным слипание частиц. Нейтрализация заряда полимера обычно приводит к выпадению его в осадок. Нуклеиновые кислоты осаждаются из раствора при добавлении сильных кислот, например хлорной, и при добавлении солей многозарядных ионов, например лантанидов. С этим же связано действие ионной силы на растворимость белков — высокая концентрация соли приводит к сжатию ионной атмосферы, образуемой противоионами, что ослабляет электростатическое отталкивание и облегчает сближение молекул полимера до критического расстояния, на котором ван-дер-ваальсово притяжение пересиливает кулоновское отталкивание и полимер выпадает в осадок. При этом концентрация соли, необходимая для осаждения, различна для разных белков, т.е. при определенной ее концентрации из сложной смеси выпадает в осадок лишь определенная группа белков. Остальные остаются в растворе и могут быть высажены последующим повышением концентрации осадителя. Наиболее широко используется с этой целью осаждение сульфатом аммония. Популярность в этой роли именно сульфата аммония связана, во-первых, с его очень высокой растворимостью, а кроме того, с тем, что, согласно многочисленным экспериментальным данным, даже высокие концентрации этой соли не оказывают заметного повреждающего (денатурирующего) действия на белки.

Заряд белков обусловлен в первую очередь остатками аспартата и глутамата, имеющими при нейтральном и щелочных значениях pH отрицательный заряд, и остатками лизина и аргинина, имеющими при слабоосновных и тем более при нейтральном и кислых pH положительный заряд. По мере повышения pH заряд белков проходит от положительных к отрицательным значениям и в изоэлектрической точке (см. § 3.1) оказывается равным нулю. Вблизи этой области белок оказывается лишенным ионной атмосферы и его молекулы могут беспрепятственно сближаться до радиуса действия ван-дер-ваальсова притяжения. В ряде случаев это приводит к выпадению белка в осадок. Такой способ выделения белков из раствора называют *изоэлектрическим осаждением*.

Выпавший осадок биополимера можно отделить от раствора фильтрованием. Известно, что фильтрование является высокопроизводительной операцией, применяющейся даже в промышленных масштабах. В то же время часто из-за мелкого размера выпавших частиц фильтрование проходит очень медленно, что затягивает процедуру выделения и может служить источником нежелательной инактивации биополимера. Поэтому в тех случаях, когда это не противопоказано масштабами разделения, в биохимии предпочитают использовать центрифуги. Широко используются рефрижераторные центрифуги с охлаждением камеры, в которой вращается ротор. Частицы осажденного вещества под действием центробежного поля 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*), создающие центробежное ускорение порядка 10^5 ускорений силы тяжести, т.е. порядка 10^6 м·с$^{-2}$, позволяют осаждать даже некоторые достаточно крупные индивидуальные надмолекулярные агрегаты, такие, как рибосомы и вирусы.

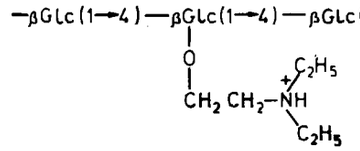
На начальных стадиях выделения биополимеров из растворов, осадков, а в ряде случаев и из исходной биомассы нередко используют экстракцию. Например, для выделения из биологического материала суммарной фракции липидов применяют экстракцию серным эфиром. Для очистки нуклеиновых кислот от основной массы белков и других биополимеров широко используется фенольная

экстракция — обработка материала смесью вода — фенол. Нуклеиновые кислоты при этом переходят в водную фазу, т.е. в насыщенный раствор фенола в воде, а белки в основной массе денатурируют и располагаются на границе раздела водной и фенольной фаз — в интерфазе.

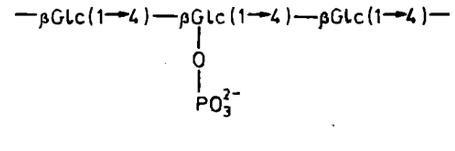
Многие задачи по разделению веществ решаются с помощью сорбции части компонентов смеси на тех или иных сорбентах. В биохимии для этой цели часто используют гель фосфата кальция, известный также под названием гидроксиапатит. Для освобождения от низкомолекулярных соединений, содержащих ароматические кольца, применяют адсорбцию на активированном угле. Такие соединения взаимодействуют по механизму стекинга с полиароматической системой графита, составляющего основу активированного угля.

Заряженные компоненты можно сорбировать на ионитах — сорбентах, имеющих на поверхности заряженные группы. В исходном состоянии эти заряды в основном скомпенсированы какими-либо подвижными противоионами. Практически при сорбции на ионитах происходит обмен этих противоионов на сорбируемые одноименно заряженные компоненты разделяемой смеси, в связи с чем такую сорбцию часто называют ионообменной. Если на поверхности сорбента находятся отрицательно заряженные группы, то он связывает катионы и его называют катионитом. Сорбент, несущий положительно заряженные группы, называют антионитом.

В качестве ионитов чаще всего используют материалы на гидрофильной основе — целлюлозе, декстране, силикагеле или пористых стеклах. Эти материалы превращаются в производные, несущие положительно заряженные анионообменные группы или отрицательно заряженные катионообменные группы. Так, на основе целлюлозы путем соответствующих химических обработок получают диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу) и фосфоцеллюлозу, функциональные группы которых связаны через гидроксигруппы с остатками глюкозы:

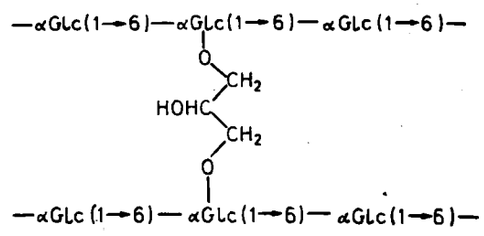


фрагмент ДЭАЭ-целлюлозы



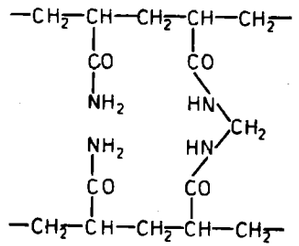
фрагмент фосфоцеллюлозы

Наконец, разделение может проводиться по размеру частиц с использованием ситового эффекта. Молекулярные сита представляют собой материалы с порами определенного размера или с порами, размер которых находится в некотором определенном не очень широком диапазоне. Вещества, молекулы которых по размеру меньше, чем размеры пор молекулярного сита, при пропускании через колонку с таким ситом задерживаются на некоторое время в этих порах и движутся медленнее, чем большие молекулы, которые обтекают частички сита и выходят в свободном объеме раствора. В качестве молекулярных сит в биохимии наиболее широкое применение нашли так называемые сефадексы, представляющие собой полисахарид декстран, обработанный эпихлоргидрином, в результате чего слабо разветвленные цепи декстрана оказываются соединены (сшиты) трехуглеродными мостиками:



фрагмент сшитого участка сефадекса

Используется также синтетический полимер — полиакриламид, линейные цепи которого сшиты метиленовыми мостиками:



Фрагмент сшитого участка полиакриламида

Сшивки в этом случае возникают в результате добавления метиленбисакриламида в реакционную смесь, в которой проходит цепная свободнорадикальная полимеризация акриламида. Размер пор образующихся молекулярных сит регулируется при их получении количеством добавляемого сшивающего реагента. Вода, находящаяся в порах гранул молекулярного сита, образует неподвижную фазу, и в эти поры могут диффундировать частицы, имеющие не слишком большой размер. Для больших молекул эти поры недоступны и они проходят через колонку, заполненную гранулами молекулярного сита (геля), не задерживаясь и поэтому существенно опережая низкомолекулярные компоненты. Такой процесс разделения называют *гель-фильтрацией*.

Во многих из перечисленных методов разделения применяются в значительных количествах различные вспомогательные низкомолекулярные вещества — органические растворители, соли и кислоты, создающие нужные значения ионной силы и pH. Перед окончательным выделением очищенного биополимера или перед тем как подвергать частично очищенный материал следующей стадии фракционирования, обычно требуется избавиться от этих вспомогательных соединений. Для этой цели широко используется процедура, называемая *диализом*. Она основана на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для биополимеров. Чаще всего с этой целью используют мембраны (пленки) из целлофана, который представляет собой нитрат целлюлозы с содержанием остатков нитрата порядка одного моля на моль остатков глюкозы. Такой материал обладает необходимой механической прочностью и в то же время достаточно гидрофилен, чтобы через него проходили молекулы воды и гидрофильных низкомолекулярных компонентов. В то же время для полимерных

молекул, в том числе для белков и нуклеиновых кислот, целлофан непроницаем. В лабораторном варианте подлежащий диализу раствор биополимера помещают в мешок из целлофана и погружают последний в сосуд с водой. Многократная смена воды или, еще лучше, непрерывный поток воды через этот сосуд приводят к полному переходу в него всех проходящих через целлофан компонентов, а биополимеры остаются внутри целлофанового мешка. На этом же принципе основана *ультрафильтрация*, при которой через проницаемую для низкомолекулярных веществ мембрану, закрепленную на пористой механически прочной подложке, пропускают под давлением подлежащий очистке раствор.

Все описанные выше методы грубого фракционирования, широко используемые на начальных этапах выделения биополимеров из биомассы, чаще всего не приводят к желаемому конечному результату, т.е. к получению индивидуального вещества. Последнее, как правило, достигается при использовании группы методов, которые можно квалифицировать как *зональные методы разделения*. Общая идеология этих методов состоит в том, что создается некоторая система, в которой компоненты смеси перемещаются с различными скоростями. Если в такую систему ввести разделяемую смесь в виде некоторой зоны, то по мере ее перемещения компоненты смеси, движущиеся в разными скоростями, будут формировать отдельные зоны, которые в конце процедуры разделения можно механически разнести в различные приемники, т.е. получить целую серию фракций.

Следует отметить, что скорость перемещения каждого компонента в определенной системе разделения и при заданных внешних условиях является его физико-химической константой и может быть использована для идентификации вещества или регистрации его присутствия в некоторой системе. Поэтому зональные методы наряду с их огромным препаративным значением имеют и важное аналитическое применение.

Важнейшим зональным методом является хроматография*. Как известно, хроматография бывает газовой, газожидкостной и жидкостной. По очевидным причинам при разделении биополимеров и их анализе используется только жидкостная хроматография. В жидкостной хроматографии зона разделяемых веществ в помощью тока элюирующей жидкости перемещается относительно неподвижной фазы, которая обладает разным сродством к разделяемым компонентам. При перемещении зоны с помощью тока элюента каждый из разделяемых компонентов проводит некоторую часть времени на неподвижной фазе, причем тем большую, чем выше его сродство к этой фазе. Чем больше это время, тем медленнее перемещается зона, содержащая выделяемое или анализируемое вещество, относительно неподвижной фазы.

В зависимости от природы физико-химического явления, лежащего в основе распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами, различают адсорбционную, ионообменную, распределительную и гель-хроматографию. Последнюю также называют эксклюзионной хроматографией. В адсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы наиболее широко используют оксид алюминия. В ионообменной хроматографии используются те же типы ионитов, что и в ионообменной сорбции.

---

*См. *Кнорре Д.Г., Крылова Л.Ф., Музыкантов В.С.* Физическая химия.— М.: Высшая школа, 1990. § 18.4.

Распределительная хроматография основана на распределении веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами. При разделении биополимеров используют водно-органические фазы. Неподвижная жидкая фаза формируется в результате ее закрепления на пористом нерастворимом носителе силами полимолекулярной адсорбции. Если носитель по своей природе гидрофилен (целлюлоза, силикагель, стекло), то неподвижной является более гидрофильная жидкая фаза. Если же полимер, например силикагель, модифицирован объемистыми гидрофобными радикалами, то неподвижной является более гидрофобная фаза. В этом случае разделение называют *хроматографией с обращенной фазой.*

В гель-хроматографии используют те же типы материалов, что и в гель-фильтрации, но подбирают гели с таким диапазоном размеров пор, чтобы часть из них была доступна для разделяемых компонентов. Вследствие неоднородности пор чем больше по размерам разделяемые молекулы, тем меньшее число пор доступно для этих молекул и соответственно тем меньшую долю времени они будут проводить в неподвижной фазе. Следовательно, зоны, отвечающие молекулам большего размера, будут перемещаться с более высокими скоростями.

Следует напомнить, что чем ближе к равновесному распределение компонентов между подвижной и неподвижной фазами, тем более эффективно разделение. Время, необходимое для достижения равновесного распределения, тем меньше, чем меньше размеры частиц. Однако с уменьшением размера частиц сорбента сопротивление заполненной колонки потоку элюента становится сильнее. Поэтому необходимо использовать высокое давление для того, чтобы достигнуть хорошего разделения за короткое время. В последние десятилетия развивались специальные методы, основанные на применении высокого давления, позволяющего проводить элюцию за несколько минут, используя маленькие размеры частиц неподвижной фазы. Этот метод называют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ, или HPLC, High Pressure Liquid Chromatography). Приборы для ВЭЖХ (HPLC-хроматографы) выпускаются многими фирмами и стали неотъемлемой аппаратурой в каждой биохимической лаборатории. Значительное число сорбентов разрабатывается в различных фирмах, и колонки, наполненные этими сорбентами, также поставляются соответствующими фирмами. Все HPLC-приборы высокоавтоматизированы, что позволяет проводить непрерывную регистрацию разных физических характеристик элюируемого материала.

В табл. 7.1 приведены сорбенты и носители, наиболее широко используемые в жидкостной хроматографии биополимеров.

Таблица 7.1. **Сорбенты и носители, используемые в жидкостной хроматографии биополимеров**

Полимерная основа и коммерческое название	Природа функциональных групп	Область применения
Целлюлоза		
CM-целлюлоза	Карбоксиметильная $-O-CH_2-COO^-$	Носитель для распределительной хроматографии
P-целлюлоза	Фосфоцеллюлоза $-O-PO_3^{2-}$	Катионообменная хроматография
SE-целлюлоза	Сульфоэтильная $-O-C_2H_4-SO_3^-$	»
ДЕАЕ-целлюлоза	Диэтиламиноэтильная $-O-C_2H_4\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Анионообменная хроматография
AE-целлюлоза	Аминоэтильная $-O-C_2H_4\overset{+}{N}H_3$	То же
TEAE-целлюлоза	Триэтиламиноэтильная $-O-C_2H_4-\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	»
Другие полимерные полисахариды (от G-10 до G-200)*	Декстраны, сшитые мостиками $-O-CH_2-CH(OH)CH_2-O-$ с помощью эпихлоргидрина	Разделение по молекулярным массам
SP-сефадекс	Сульфопропильная $-O-(CH_2)_3-SO_3^-$	Сочетание ионообменной хроматографии с молекулярно-ситовым действием
QAE-сефадекс	Триэтиламиноэтильная $-O-C_2H_4-\overset{+}{N}-(C_2H_5)_3$	
Агароза	Поперечно сшитый полисахарид на основе нейтрального компонента агара	Для фракционирования очень крупных молекул, высокополимерных ДНК вплоть до вирусов
Сефароза	Сшивка $-CH_2-CH(OH)CH_2-O-CH_2-$ образуется в результате взаимодействия с 2,3-дибромпропанолом	Носитель для аффинной хроматографии
CM-сефароза	Карбоксиметильная $-O-CH_2-COO^-$	Катионообменная хроматография

Продолжение табл. 7.1.

Полимерная основа и коммерческое название	Природа функциональных групп	Область применения
ДЕАЕ-сефароза	Диэтиламиноэтильная $-O-C_2H_4\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Анионообменная хроматография
Полистирол Сополимер стирола $C_6H_5-CHCH_2$ и дивинилбензола $C_6H_4(-CH=CH_2)_2$ Фирменные названия: дауэксы, амберлиты и др.	Сульфокатиониты $-C_6H_4-SO_3H$ Анионы	Носитель для распределительной хроматографии с неполярными и полярными растворителями Катионообменная хроматография Анионообменная хроматография
Полиакриламиды Сополимеризация акриламида $H_2C=CHCONH_2$ и N, N′-метилен-*бис*-акриламида	$H_2C=CHCONHCH_2NHCOCH=CH_2$ Карбоксиметильная $-CH_2-COO^-$ $-COONa$	Для разделения по молекулярным массам и для обессоливания
BiO-Gel (от *P*-4 до *P*-300)* Акрил (от *P*-4 до *P*-3000) Биогель СМ-2 Enzacryl CO_2H		Катионообменная хроматография (устойчив к действию растворов кислот и щелочей до 1М концентрации)
Силикагели Золи кремниевой кислоты Si40 Кизельгель 4000 (от 40 до 4000 Å) Лихросфер Si Лихросорб (Lichrocorb) Лихропреп (Lichroprep) Полигосил (Polygosil) Нуклеосил (Nukleosil)	Силанольные группы $\gg Si-OH$ Силоксановые группы $\gg Si-O-Si\ll$	Носитель для адсорбционной хроматографии
Перисорб (Perisorb) Видак (Vydac)	Гидрофобизированные силикагели $\gg Si-O-Si\ll^{CH_3}_{CH_3}R$ где R - этил (C_2), октил (C_8), октадецил (C_{18}) или фенил	Носитель для хроматографии с обращенными фазами

Продолжение табл. 7.1.

Полимерная основа и коммерческое название	Природа функциональных групп	Область применения
Гидроксиапатиты	Суспензия или порошок $3Ca_3(PO_4)_2\cdot Ca(OH)_2$	Носитель для распределительной и адсорбционной хроматографии

*В порядке возрастания размера пор, т.е. область разделения молекулярных масс.

Вторым широко используемым в биохимии зональным методом разделения смесей является электрофорез. В этом случае зоны создаются в результате того, что разные компоненты смеси с различной скоростью перемещаются в электрическом поле. Скорость перемещения v определяется основным уравнением

$$Ze\varepsilon = fv, \tag{7.1}$$

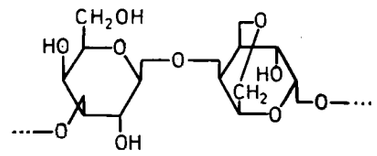
где Z — число единиц заряда у частицы; e — заряд электрона; ε — напряженность приложенного электрического поля; f — коэффициент вязкого трения частиц. Последняя величина представляет собой отношение скорости перемещения частицы в вязкой среде к приложенной силе. Согласно уравнению Стокса для сферической частицы радиуса r,

$$f_0 = 6\pi\eta r, \tag{7.2}$$

где η — вязкость среды, в которой проводится электрофорез. Радиус r сферической частицы с известной молекулярной массой и плотностью легко вычисляется, т.е. величину f_0, ожидаемую исходя из предположения о сферической форме, нетрудно рассчитать. Для частиц несферической формы f больше, чем f_0, причем чем более вытянута частица, тем существеннее это отличие. В связи с этим значение f дает определенное представление о форме биополимера. Например, для глобулярных белков это отличие, как правило, невелико, а для двуспиральных нуклеиновых кислот весьма существенно. Метод применим как для разделения нуклеиновых кислот, являющихся полианионами и всегда перемещающихся в направлении катода, так и к белкам, которые при значениях pH, отличающихся от их изоэлектрической точки, несут положительный или отрицательный заряд и в соответствии с ним перемещаются в направлении одного из электродов. Изменяя pH, можно изменять в широком диапазоне заряд белковых молекул, и поэтому белки, не разделяемые в электрофорезе при одних значениях pH, могут оказаться эффективно разделяемыми при других.

Электрофорез в растворе пока имеет весьма ограниченное применение, поскольку разделяемые по ходу электрофореза зоны, во-первых, подвергаются диффузионному размыванию, а во-вторых, что более существенно, размываются конвекционными токами, возникающими в результате незначительных неоднородностей температуры в системе, при ничтожных механических воздействиях и т.п. В настоящее время, по-видимому, начинается второе рождение этого метода в связи с возможностью проведения электрофореза в условиях невесомости на орбитальных космических станциях.

Основное практическое значение имеет электрофорез в гелях (*гель-электрофорез*). При использовании гелей практически исчезает опасность конвекции, резко уменьшается коэффициент диффузии и размывание зон незначительно. В результате на одном геле длиной около метра можно получить до сотни или даже более зон. Наиболее широко используется электрофорез в сшитых полиакриламидных и агарозных гелях. Агароза является компонентом агар-агара, содержащегося в красных морских водорослях. Она построена из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы, связанных попеременно $\beta(1 \longrightarrow 4)$- и $\alpha(1 \longrightarrow 3)$-связями:



Гель возникает в результате образования водородных связей между цепями агарозы и в отличие от полиакриламида не содержит ковалентных межцепных сшивок.

При электрофоретическом разделении нуклеиновых кислот в геле удается разделять фрагменты длиной в сотни нуклеотидов, различающиеся на одно звено. При этом действуют два фактора — удлинение полинуклеотида приводит одновременно к возрастанию заряда и к увеличению сопротивления среды его перемещению. Второй фактор пересиливает, и в связи с этим быстрее перемещаются более короткие полинуклеотидные фрагменты. Примеры электрофореграмм приведены на рис. 77 и 78.

Зональное разделение можно также проводить с помощью седиментации биополимеров в центробежном поле в ультрацентрифугах*. Величиной, характеризующей подвижность частиц в центробежном поле, является *константа седиментации* S, представляющая собой отношение скорости перемещения седиментирующей частицы к величине центробежного ускорения $\omega^2 r$, где ω — угловая скорость вращения ротора ультрацентрифуги, r — расстояние частицы до оси ротора. Константа седиментации может быть экспериментально определена в специальных аналитических центрифугах, позволяющих фиксировать положение зоны, содержащей исследуемый биополимер, в произвольный момент времени непосредственно во вращающемся роторе и тем самым измерять скорость перемещения частиц. Константа седиментации выражается уравнением

$$S = m[1 - (\rho_0/\rho)]/f, \qquad (7.3)$$

где m — масса частицы; ρ_0 — плотность растворителя; ρ — так называемая плавучая плотность частицы, т.е. та плотность, которую она имеет, находясь в растворе (это величина, равная $1/\upsilon_{уд}$, где $\upsilon_{уд}$ — парциальный удельный объем); f — коэффициент вязкого трения.

Если разделяемую смесь нанести в виде зоны поверх растворителя в центрифужной пробирке, то в ходе центрифугирования вещества, различающиеся по константам седиментации, будут формировать отдельные зоны. По окончании центрифугирования можно либо проколоть дно пробирки и по каплям разлить содержимое в ряд приемников так, чтобы образовавшиеся зоны попали в разные приемники, либо отсосать содержимое пробирки через опущенную до дна трубочку, опять-таки собирая серию фракций. Чтобы не происходило перемешивания содержимого пробирки при раскручивании ротора и при его остановке, используют специальные роторы (так называемые бакет-роторы от англ. bucket — ведро), в которых пробирки подвешены на шарнирах и разворачиваются по направлению поля от вертикального в начальный момент времени (направление поля силы тяжести) до практически горизонтального при полном наборе скорости и в обратном направлении при остановке ротора.

Чаще всего разделяемую смесь наносят на раствор сахарозы, который приготовлен таким образом, что уже в верхнем слое его плотность выше, чем плотность наносимого образца (иначе произошло бы практически мгновенное перемешивание), и постепенно возрастает в направлении к дну пробирки. Наличие градиента концентрации сахарозы существенно ослабляет диффузионное размывание зон, так как если по ходу перемещения зоны какого-либо биополимера часть его в результате диффузии опережает движение основной зоны, то она попадает в область с более высокой плотностью растворителя ρ_0 и в соответствии с (7.3) их перемещение затормаживается, а в случае их диффузии в сторону отверстия пробирки по той же причине их движение ускоряется. В обоих случаях частицы, ушедшие из «своей» зоны в результате диффузии, отбрасываются обратно.

Поскольку при наличии аналитической ультрацентрифуги константы седиментации легко определяются путем фотографирования границы седиментации исследуемого биополимера при нескольких различных временах от начала седиментации, то константы седиментации часто используют как физико-химические характеристики биополимеров и их комплексов. Применительно к рибосомам это уже отмечалось в § 3.8.

Описанные выше методы по своей сути динамические, разделение происходит по мере перемещения веществ вдоль системы. Наряду с ними применение нашли равновесные зональные методы, в которых система приводится в равновесие с некоторым приложенным внешним полем — электрическим или центробежным — и зоны, соответствующие разным веществам, останавливаются в разных участках системы.

Наиболее широкое применение нашел метод *изоэлектрической фокусировки*. Он основан на создании под действием внешнего электрического поля стабильного градиента pH, причем значение pH возрастает от анода к катоду. В такой системе каждый белок перемещается в том или ином направлении в соответствии со знаком своего заряда до тех пор, пока не достигнет участка, в котором значение pH совпадает с его изоэлектрической точкой. На этом участке дальнейшее его перемещение под действием электрического поля прекращается, так как его заряд становится равным нулю. Приложенное поле, поддерживающее стабильный градиент pH, препятствует также диффузному размыванию зоны. Механизм аналогичен только что рассмотренному эффекту градиента плотности раствора сахарозы на стабилизацию зон при седиментации. Действительно, если в результате диффузии белок уходит из участка, на котором pH = pI, в сторону катода, он попадает в область более высоких значений pH и заряжается отрицательно. Под

* См. *Кнорре Д.Г., Крылова Л.Ф., Музыкантов В.С.* Физическая химия — М.: Высшая школа, 1990. § 18.3.

действием электрического поля он должен начать перемещаться к аноду, т.е. вернуться на исходный участок. То же самое происходит и в случае диффузии в сторону анода. Если сочетать эту процедуру с использованием полиакриламидного геля, то зоны получаются очень узкими и внешне напоминают изображение хорошо сфокусированного пучка, с чем и связано название метода.

Для создания стабильного градиента pH используют специальные вещества, получившие название амфолинов. Это смесь коротких полимерных молекул, содержащих в различных соотношениях карбоксильные и аминогруппы. Иными словами, амфолины — это смесь молекул амфотерных электролитов с разными значениями изоэлектрических точек. В постоянном электрическом поле они перемещаются в растворе или в геле до достижения зоны, в которой их суммарный заряд равен нулю, после чего до тех пор, пока приложено электрическое поле, они будут оставаться на месте. На этом участке они играют роль буферного компонента, поддерживающего стабильное значение pH.

В центробежном поле можно создать стабильный градиент плотности растворителя. Как известно из теории седиментации, вследствие диффузионного размывания границы седиментации в конечном итоге в центрифужной ячейке устанавливается равновесное распределение концентрации каждого компонента, описываемое уравнением

$$c = c_0 \exp\{-m\omega^2 [1 - (\rho_0/\rho)] (r_0^2 - r^2)/(2kT)\}, \qquad (7.4)$$

где c — концентрация в точке, находящейся на расстоянии r от оси ротора; c_0 — концентрация на дне ячейки, находящейся на расстоянии r_0 от оси ротора.

Используя соответствующую соль, можно создать устойчивый в условиях центрифугирования градиент ее концентрации, а тем самым и градиент плотности растворителя. Если природа соли и распределение ее концентрации таковы, что плавучая плотность биополимера выше, чем плотность растворителя на мениске, но ниже, чем у дна пробирки, то по мере перемещения к дну пробирки биополимер достигнет участка, где множитель $1 - \rho_0/\rho$ станет равным нулю и дальнейшая седиментация прекратится, т.е. возникнет устойчивая зона нахождения биополимера. Наиболее широкое применение для этой цели нашли растворы солей цезия, которые позволяют получить растворы с плотностью, достаточной для остановки перемещения нуклеиновых кислот. Эксперименты подобного рода весьма дороги, так как требуют длительной, обычно на протяжении нескольких суток, работы ультрацентрифуг. Однако они открывают некоторые уникальные возможности. Например, удается разделить биополимеры, различающиеся лишь изотопным составом. Молекулы ДНК из одного вида микроорганизма, выращенные на средах, содержащих в качестве источника азота соли аммония $^{14}NH_4$ и $^{15}NH_4$, не отличаются по объему, но имеют разные массы и, следовательно, различные плавучие плотности. Поэтому при *равновесном центрифугировании и градиенте плотности* хлорида цезия они образуют отдельные зоны. Пример применения этого метода для доказательства полуконсервативного характера репликации ДНК приведен в § 5.1.

Все описанные зональные методы — одномерные, разделение в них происходит по одной координате. Наряду с этим, особенно для аналитических целей, применяют *двумерные системы разделения* на пластинках. При этом разделяемую смесь в виде пятна наносят на один из углов и разделяют в одном направлении. Затем

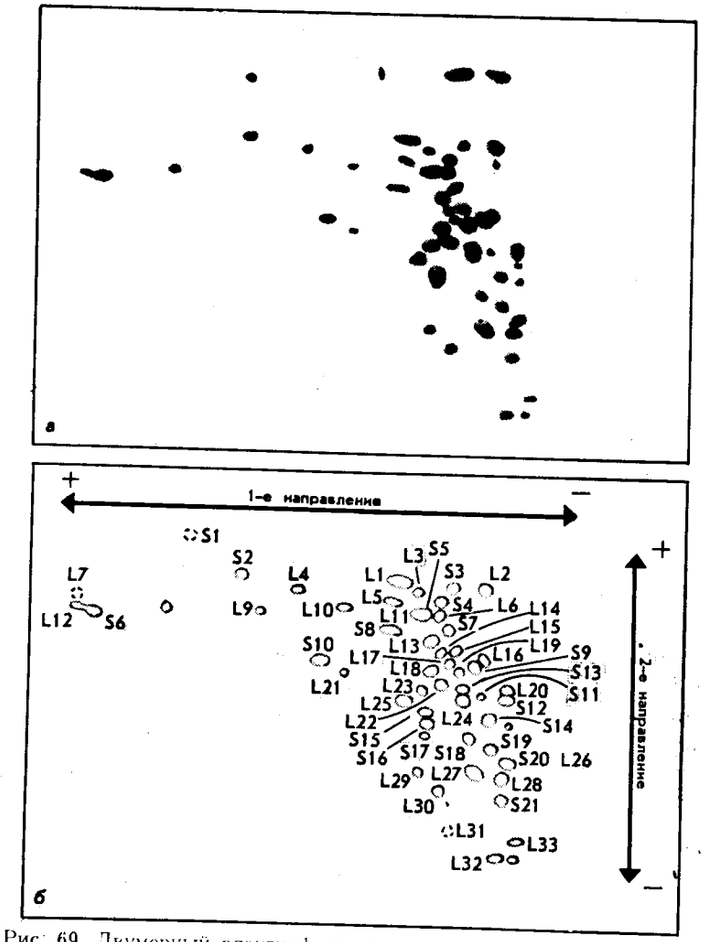


Рис. 69. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле при pH 8.2 (1-е направление) и при pH 4.0 (2-е направление) смеси белков, выделенных из рибосом *E. coli* (по данным Г.Г. Карповой):

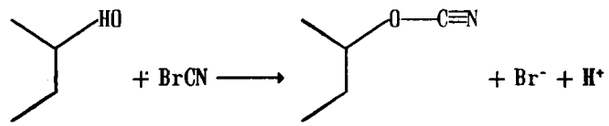
а — фотография геля после окрашивания красителем; *б* — схема расположения пятен рибосомных белков в геле

какие-либо параметры, определяющие разделительную способность системы, изменяют и проводят разделение в перпендикулярном направлении. При удачном подборе системы и условий разделения удается разделить те компоненты, которые не разделились при первой процедуре. Комбинации методов могут быть довольно разнообразны: двумерная хроматография с использованием в разных направлениях различных элюентов, хроматография в одном и электрофорез в другом направлении или, наконец, электрофорез при различных значениях pH в обоих направлениях. При этом исходное пятно разделяется на систему пятен. В качестве примера на рис. 69 приведен результат двумерного электрофореза смеси белков, выделенных из рибосом *E. coli*, когда в одном эксперименте разделяются все 53 белка, входящие в состав этого нуклеопротеида.

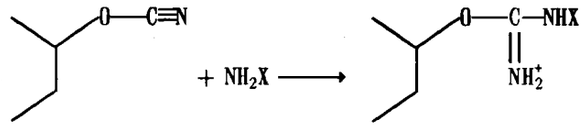
7.2. АФФИННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОПОЛИМЕРОВ

Несмотря на многообразие и высокую разделяющую способность методов, описанных в § 7.1, они оказываются бессильными при решении задач по выделению индивидуальных компонентов из сложных биологических смесей. Уже отмечалось, что иммуноглобулиновая фракция сыворотки крови состоит из тысяч различных антител, которые весьма сходны по общей структуре, что не дает надежды разделить смесь на индивидуальные компоненты традиционными методами, основанными на различиях тех или иных физико-химических характеристик компонентов. Единственным заведомым отличием каждого индивидуального иммуноглобулина является его специфичное сродство к определенному антигену. То же самое имеет место в случае смеси мРНК, которые несущественно различаются по нуклеотидному составу. Тем не менее они имеют различные нуклеотидные последовательности и соответственно могут обладать селективным сродством к олигонуклеотидам или нуклеиновым кислотам с комплементарными последовательностями.

Методы разделения, основанные на использовании специфичного сродства биополимера к определенному партнеру, получили название *аффинных методов разделения* (от англ. affinity — сродство). Наиболее широко используемый вариант аффинных методов — это использование *аффинных сорбентов*. Специфические лиганды ковалентно присоединяются к соответствующему носителю, и выделяемое вещество либо адсорбируется таким сорбентом, либо отделяется от остальных компонентов с помощью *аффинной хроматографии* с использованием того же аффинного сорбента. Разнообразие мыслимых аффинных сорбентов неисчислимо, и практически невозможно приготовить все сорбенты в коммерчески доступном виде. Оптимальным для большинства задач является наличие носителя с реакционноспособными группами, который по усмотрению исследователя может быть использован для присоединения соответствующего лиганда, подходящего для решения поставленной задачи по разделению. Количество подобных реакционноспособных носителей весьма велико. Наиболее популярной является бромциансефароза, представляющая собой сефарозу, обработанную BrC≡N, который реагирует с гидроксигруппой сефарозы, превращая ее в остаток цианата:

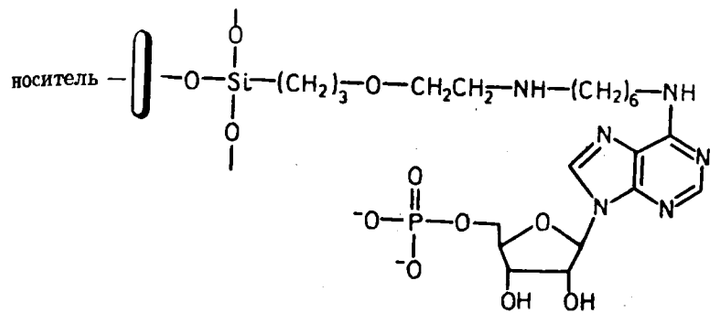


Такое производное активно по отношению к любым полимерам и низкомолекулярным соединениям, содержащим аминогруппу, образуя соответствующее производное:



Эта реакция может происходить с различными аминами — с ε-аминогруппами остатков лизина в белках, с аминогруппами гуанина, аденина и цитозина в нуклеотидах и нуклеиновых кислотах. Присоединение лигандов к носителю обычно называют *иммобилизацией*.

Можно использовать иммобилизацию субстратов для выделения соответствующих ферментов или групп ферментов. В случае субстратов с низкой молекулярной массой, для того чтобы исключить стерические помехи носителя, вводятся спейсерные фрагменты между носителем и субстратом. Так, для того чтобы выделить ферменты, обладающие сродством к остатку AMP различных коферментов, могут быть использованы производные следующей структуры:



с силикагелем в качестве носителя. Используется достаточно длинный спейсер $(CH_2)_3$—O—$(CH_2)_2$—NH—$(CH_2)_6$—, присоединенный к 6-NH_2 аденина. Этот сорбент способен удерживать на колонке различные ферменты, взаимодействующие с ATP, NAD, NADP и др. Специфичность сорбента может быть повышена использованием NAD вместо AMP в качестве аффинной группы. Дальнейшее увеличение селективности может быть достигнуто подборкой соответствующего элюента. Так, сродство лактатдегидрогеназы к такому сорбенту может быть повышено присутствием в элюенте пирувата — второго субстрата фермента. Этот фермент катализирует реакцию

$$\underset{\text{лактат}}{NAD^+ + CH_3CHOHCOO^-} \rightleftharpoons \underset{\text{пируват}}{NAD\cdot H + CH_3C(O)COO^-} + H^+$$

Присутствие пирувата увеличивает стабильность комплекса фермента с иммобилизованным коферментом, повышая сродство лактатдегидрогеназы к этому сорбенту по сравнению с другими NAD-зависимыми ферментами. Подобный метод называют аффинной элюцией.

Иммобилизация нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов позволяет получить сорбенты, способные селективно связывать определенные нуклеиновые кислоты, обладающие комплементарными последовательностями, или белки, обладающие сродством к нуклеиновым кислотам — к молекуле целиком либо ее части. Например, олиго (dT)-сефароза широко используется для извлечения эукариотических мРНК из смеси нуклеиновых кислот, так как они имеют поли(A)хвосты на 3′-конце полинуклеотидной цепи. После образования комплементарных комплексов с иммобилизованным олиго(dT) и отделения всех других компонентов смеси эти мРНК могут быть легко элюированы после повышения температуры выше точки плавления соответствующего дуплекса.

Важной группой аффинных сорбентов являются иммобилизованные антитела, или антигены. В первом случае сорбенты могут быть использованы для специфического выделения определенных антигенов, или гаптенов, из сложных смесей. В этом случае эти сорбенты называют *иммуносорбентами*. Во втором случае иммобилизованные антигены способствуют выделению антител с определенной специфичностью из сложной смеси антител.

В заключение следует отметить, что аффинные методы разделения в ряде случаев оказываются более эффективными для решения задач, в принципе доступных традиционным методам, поскольку позволяют уменьшить число стадий, а в отдельных случаях провести выделение необходимого компонента в одну стадию.

7.3. МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ

Как при выделении и очистке биополимеров, так и при проведении разнообразных исследований необходимо количественное определение содержания биополимера в полученной фракции, в выделенном или исследуемом образце. Во введении к этой главе уже указывалось, что биохимические исследования проводятся, как правило, с очень небольшим количеством материала и поэтому требуют высокочувствительных методов детекции. Наиболее широко распространенные методы детекции основаны на измерении оптического поглощения (спектрофотометрия), радиоактивности (радиохимические методы) или свечения образцов (люминесцентные методы).

Спектрофотометрические методы применимы в тех случаях, когда детектируемые вещества обладают характерным спектром поглощения в видимой или ультрафиолетовой области. В табл. 7.2 приведены характерные максимумы поглощения для компонентов нуклеиновых кислот (максимальные поглощения для компонентов ДНК и РНК близки), для аминокислот, поглощающих в средней УФ-области спектра, и некоторых упоминавшихся в тексте низкомолекулярных соединений. Приведенные значения молярных экстинкций для аминокислот и нуклеотидов дают представление о порядке величин молярных экстинкций биополимеров, поскольку эти значения варьируют в составе биополимеров в не очень широких пределах. При применении спектрофотометрического метода для детекции биополимеров по ходу фракционирования следует иметь в виду, что в используемых водных растворах практически всегда присутствуют различные низкомолекулярные соединения, в первую очередь вспомогательные электролиты, вводимые для создания нужных значений pH и ионной силы. Эти соединения должны быть прозрачны в области поглощения, используемой для детекции выделяемых биополимеров, тем более что концентрация вспомогательных веществ нередко на несколько порядков превышает концентрацию биополимеров.

Если поглощение растворителя при используемой длине волны отсутствует, то количество анализируемого вещества находят по формуле

$$n = AV/(\varepsilon l), \qquad (7.5)$$

где A — измеренная оптическая плотность; V — объем измеряемой пробы; ε — молярный коэффициент экстинкции; l — длина пути светового пучка через кювету.

Если измерения проводятся в области спектра, в которой поглощает каждое

Таблица 7.2. **Молярная экстинкция в максимумах поглощения для компонентов нуклеиновых кислот, аминокислот, пептидной связи и некоторых других низкомолекулярных соединений и чувствительность их спектрофотометрического определения**

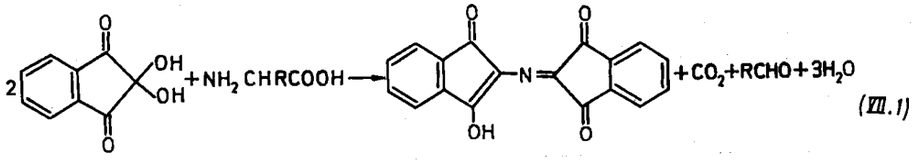
Название соединения	λ_{max}, нм	Молярная экстинкция при pH 7 и 25 °C, $м^{-1} \cdot см^{-1}$	Количество вещества, моль, соответствующее оптической плотности 0,1 в кювете объемом	
			1 $см^3$	1 $мм^3$
Аденозин-5-монофосфат	259	$15{,}4 \cdot 10^3$	$6{,}49 \cdot 10^{-9}$	$6{,}49 \cdot 10^{-12}$
Гуанозин-5-монофосфат	252	$13{,}7 \cdot 10^3$	$7{,}20 \cdot 10^{-9}$	$7{,}20 \cdot 10^{-12}$
Цитидин-5-монофосфат	272	$9{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}1 \cdot 10^{-8}$	$1{,}1 \cdot 10^{-11}$
Уридин-5-монофосфат	261	$10{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}0 \cdot 10^{-8}$	$1{,}0 \cdot 10^{-11}$
Тимидин-5-монофосфат	267	$9{,}6 \cdot 10^3$	$1{,}04 \cdot 10^{-8}$	$1{,}04 \cdot 10^{-11}$
Триптофан	280	$6{,}0 \cdot 10^3$	$1{,}6 \cdot 10^{-8}$	$1{,}6 \cdot 10^{-11}$
Тирозин	275	$1{,}4 \cdot 10^3$	$7{,}1 \cdot 10^{-8}$	$7{,}1 \cdot 10^{-11}$
NAD^+	259	$18{,}0 \cdot 10^3$	$5{,}5 \cdot 10^{-9}$	$5{,}5 \cdot 10^{-12}$
NADH	340	$6{,}22 \cdot 10^3$	$1{,}6 \cdot 10^{-9}$	$1{,}6 \cdot 10^{-12}$
Хлорофилл *a*	660	$7{,}4 \cdot 10^4 - 9{,}1 \cdot 10^4$	$1{,}19 \cdot 10^{-9}$	$1{,}19 \cdot 10^{-12}$
Хлорофилл *b*	660	$4{,}7 \cdot 10^4 - 5{,}1 \cdot 10^4$	$1{,}95 \cdot 10^{-9}$	$1{,}95 \cdot 10^{-12}$

мономерное звено биополимера, то для многих целей удобно расчет вести не на моль биополимера, а на моль мономерных звеньев. Это относится к спектрофотометрическому определению нуклеиновых кислот в области 260 нм, в которой поглощает каждый гетероцикл, и к определению белков в области 200 нм, в которой поглощает каждая пептидная связь. В средней УФ-области у белков поглощение происходит в первую очередь за счет остатков триптофана и в меньшей мере за счет остатков тирозина, число которых в составе полимерной молекулы невелико и резко варьирует от белка к белку. Поэтому при использовании этой области для спектрофотометрической детекции белков целесообразно пользоваться молярными величинами для биополимера в целом. Максимум поглощения у триптофансодержащих белков находится вблизи 280 нм. Поэтому иногда соотношение поглощения фракции при 260 и 280 нм используют для того, чтобы оценить, какая группа биополимеров — белки или нуклеиновые кислоты — преобладает во фракции.

Чувствительность спектрофотометрического метода, как видно из формулы (7.5), существенно зависит от молярной экстинкции анализируемого вещества и от геометрических параметров кюветы. Современные спектрофотометры позволяют с удовлетворительной степенью точности регистрировать оптические плотности порядка 0,1. Поэтому на серийных приборах с кюветами емкостью порядка 1 $см^3$ и длиной пути светового пучка 1 см для веществ с молярной экстинкцией порядка $10^4 М^{-1} \cdot см^{-1}$ может быть детектировано 10^{-8} моль вещества. Для нуклеотидов и нуклеотидных фрагментов в составе нуклеиновых кислот, имеющих молекулярную массу в пределах 300–400, это означает возможность детектировать несколько микрограммов нуклеотидного материала. На микроспектрофотометрах

класса отечественных приборов «Милихром» с объемом кюветы 1 мкл и длиной пути светового пучка 1 мм, которые могут регистрировать оптическую плотность порядка 0,01, чувствительность на три порядка выше, т.е. применительно к нуклеотидам и нуклеиновым кислотам достигает нескольких нанограммов.

Вещества, не обладающие поглощением в удобном для измерений спектральном диапазоне, могут быть окрашены с помощью специальных химических превращений. Наиболее широко известный в биохимии пример такого рода — превращение аминокислот в синий краситель путем обработки *нингидрином* (трикетогидриндегидратом). Стехиометрическое уравнение реакции записывается в виде



(VII.1)

Эта реакция широко применяется в анализе аминокислотного состава белков. Для этой цели белки подвергают расщеплению до аминокислот путем кипячения в течение 20 ч с 6 н. HCl. При такой обработке повреждаются триптофан и амиды дикарбоновых кислот, которые гидролизуются до NH_4^+ и свободных кислот. Далее проводят их хроматографическое разделение, причем для выявления зон, содержащих аминокислоты, хроматограмму прокрашивают нингидрином. Эти операции могут проводиться на специальных приборах — *аминокислотных анализаторах*. В этом случае полученный гидролизат наносят на хроматографическую колонку и затем элюируют по стандартной программе, обеспечивающей разделение всех аминокислот, входящих в состав белков. Перед регистрацией выходящего элюата к нему примешивают нингидрин и смесь пропускают через специальный термостат, время прохождения через который и температура подобраны таким образом, чтобы процесс (VII.1) полностью завершился. После выхода из термостата окрашенные зоны проходят через кювету фотометра, в котором проводится количественное измерение содержания красителя, а тем самым и содержания аминокислоты. Так как каждая аминокислота в этой системе имеет определенное время выхода из колонки, то идентификация аминокислот, соответствующих окрашенным зонам, не вызывает затруднений.

Чрезвычайно широко при исследовании компонентов живой материи, в том числе биополимеров, применяются *радиохимические методы*. В ходе фракционирования биологического материала они могут быть применены, если живые организмы выращивались на среде, содержащей радиоактивные предшественники биополимеров, получали их в составе продуктов питания или при инъекциях. Используют главным образом изотоп водорода ^3H (тритий), изотоп углерода ^{14}C, изотопы фосфора ^{32}P и ^{33}P, изотоп серы ^{35}S. Два важнейших биогенных элемента — азот и кислород — имеют изотопы ^{13}N и ^{15}O, распадающиеся с испусканием позитронов. Так же распадается и изотоп углерода ^{11}C. Они являются перспективными для использования в позитронной томографии, основанной на введении изотопов в живые организмы и обнаружении и локализации их в организме по γ-излучению, возникающему при аннигиляции позитронов и электронов. Поскольку время полураспада всех этих изотопов измеряется минутами, работа с ними требует специальной биохимической техники, позволяющей получить из них необходимые предшественники и ввести в организм за весьма короткое время. Однако перспективы использования таких ультракороткоживущих радиоактивных изотопов в биологии и медицине настолько заманчивы, что ведется работа, нацеленная на разработку соответствующей высокоавтоматизированной биохимической и радиологической аппаратуры и соответствующих процессов, и уже сделаны первые существенные шаги в этом направлении.

Чувствительность радиохимических методов непосредственно связана со скоростью радиоактивного распада используемых изотопов, которую чаще всего характеризуют периодом полураспада $t_{1/2}$. Из основного уравнения радиоактивного распада

$$-dn/dt = kn,$$

где n — число радиоактивных атомов в образце; k — константа скорости распада, связанная с периодом полураспада соотношением $k = 0{,}693/t_{1/2}$, следует, что число радиоактивных атомов в исследуемом образце при регистрируемом с помощью счетчиков радиоактивности числе распадов в единицу времени $|dn/dt|$ составляет

$$n = 1{,}3t_{1/2}|dn/dt|.$$

Так как современные счетчики радиоактивности надежно регистрируют небольшое число распадов в секунду, то чувствительность радиохимической детекции, т.е. минимальное число атомов радиоактивного материала, которое может быть с удовлетворительной точностью измерено радиохимически, имеет порядок $10t_{1/2}$. Например, для изотопа фосфора ^{32}P, имеющего период полураспада 14,5 сут, эта величина составляет 10^7 атомов, т.е. порядка 10^{-17} моль. В табл. 7.3 приведены периоды полураспада, тип и энергия радиоактивного излучения и число надежно регистрируемых молей для перечисленных выше изотопов. Для нуклеиновых кислот, у которых в пределе может содержаться по одному атому ^{32}P на каждое нуклеотидное звено, можно детектировать до 10^{-13} г вещества.

Таблица 7.3. **Периоды полураспада, тип и энергия радиоактивного излучения, регистрируемое количество атомов некоторых изотопов, моль**

Изотоп	Испускаемое излучение	Период полураспада	E, МэВ	Количество изотопа, соответствующее 10 расп/с, моль
^{14}C	β	5770 лет	0,156	$4{,}39\cdot10^{-12}$
^{3}H	β	12,26 >	0,0186	$9{,}57\cdot10^{-15}$
^{35}S	β	86,7 сут	0,167	$1{,}81\cdot10^{-16}$
^{32}P	β	14,3 >	1,71	$3{,}02\cdot10^{-17}$
^{33}P	β	25 >	0,25	$5{,}22\cdot10^{-17}$
^{125}I	γ	57,4 >	0,035	$11{,}98\cdot10^{-17}$
^{131}I	β, γ	8,05 >	0,6(β) 0,36(γ)	$1{,}68\cdot10^{-17}$

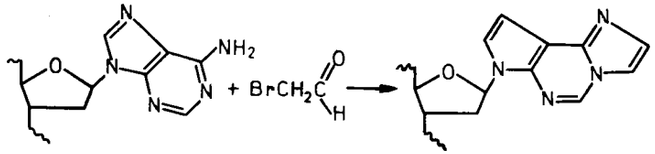
В некоторых случаях удается подобрать для детекции систему, которая испускает свет в видимой или ультрафиолетовой области. Методы, основанные на измерении испускания света, называют *люминесцентными методами*. При достаточно высокой интенсивности свечения люминесцентные методы по чувствительности существенно превосходят спектрофотометрические, поскольку при этом измеряется абсолютная интенсивность испускаемого света, в то время как при спектрофотометрии определяется уменьшение интенсивности пучка света в результате прохождения через исследуемый образец, которое при низких концентрациях поглощающего вещества является малой разностью больших величин.

Наиболее широко распространены *флуориметрические методы*, основанные на измерении флуоресценции. При поглощении ультрафиолетового или видимого излучения молекулы переходят в электронно-возбужденное состояние. Полученная энергия может полностью переходить в энергию теплового движения, а может с определенной вероятностью (квантовым выходом) испускаться в виде рассеянного электромагнитного излучения, как правило, с частотой, меньшей частоты возбуждающего излучения. Это рассеянное излучение называют флуоресценцией. Его интенсивность можно измерить с высокой чувствительностью в любом направлении, даже отличающемся от направления пучка возбуждающего излучения, лучше всего в перпендикулярном ему направлении. При использовании достаточно чувствительных фотоэлектронных умножителей это позволяет регистрировать концентрации флуорофоров, практически недоступные спектрофотометрическому методу. Для веществ с достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции удается регистрировать концентрации флуорофора порядка 10^{-10} М и ниже.

Использование флуорометрических методов ограничивается тем, что далеко не все поглощающие ультрафиолетовое излучение вещества являются достаточно эффективными флуорофорами. Тем не менее среди них находятся такие аминокислоты, как триптофан и тирозин, в результате чего флуоресцируют все содержащие их белки. При облучении светом длиной волны 280 нм, т.е. в максимуме поглощения остатков триптофана, наблюдается флуоресценция с максимумом испускания при 348 нм.

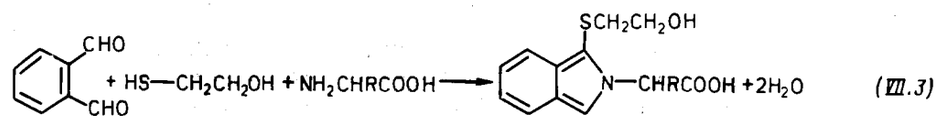
Сильным флуорофором является восстановленное никотинамидное кольцо, в результате чего интенсивной флуоресценцией обладает NADH, у которого максимум поглощения и максимум испускания находятся соответственно при 340 и 450 нм.

Широко используется в аналитических целях введение флуоресцирующих групп в различные мономеры и биополимеры. Например, остатки цитозина и аденина в составе нуклеиновых кислот и нуклеотидов могут быть превращены в интенсивно флуоресцирующие этенопроизводные обработкой хлор- и бромацетальдегидом по реакции, которая в случае аденина может быть записана в виде



(VII.2)

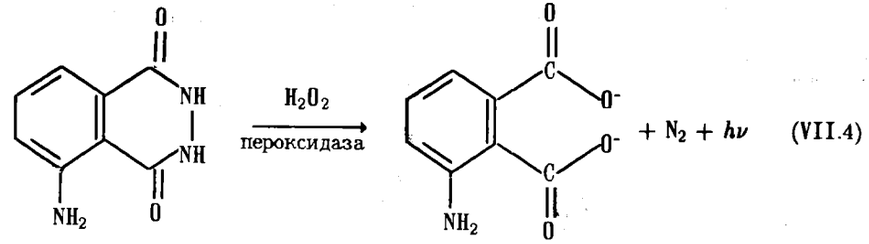
Аминокислоты могут быть превращены во флуоресцирующие производные обработкой *о*-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола по реакции



(VII.3)

Это превращение используют в настоящее время при анализе аминокислотного состава белков вместо описанной выше обработки нингидрином.

В некоторых системах испускание происходит в результате образования молекул продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии. Примером такой реакции, нашедшей практическое применение при биохимическом анализе, является катализируемое пероксидазой окисление *люминола* пероксидом водорода по реакции



(VII.4)

люминол 3-аминофталат

такое свечение называют *хемилюминесценцией*.

Наконец, известны отдельные процессы испускания света, происходящие в живых организмах — светящихся бактериях и светляках. Это явление называют *биолюминесценцией*. Примером такой реакции является катализируемое люциферазой из светляков окисление люциферриладенилата (8) (см. § 2.1). Поскольку образование люциферриладенилата требует участия АТФ, интенсивность свечения связана с количеством АТФ в образце. Это открывает возможность измерять количество АТФ в образце по уровню биолюминесценции с исключительно высокой чувствительностью (до 10^{-18} моль).

Важной характеристикой методов детекции является их селективность. Большие возможности повышения селективности описанных выше методов открывает использование ферментативных реакций. Следует рассмотреть два основных случая. Первый — это определение присутствия и количества фермента по его ферментативной активности, например его содержания во фракциях по ходу выделения. Очевидно, что регистрация ферментативной активности в некоторых фракциях дает существенно более значимую информацию, чем простое определение присутствия белка, даже если обнаруживаемый фермент обладает специфическими особенностями, например является флавопротеином с характерным для флавиновых нуклеотидов спектром поглощения. Такое поглощение будет наблюдаться и в случае смеси нескольких флавопротеинов с разными биологическими функциями. В большом же числе случаев фермент состоит только из белка и по своим спектральным характеристикам существенно не отличается от других белков, находящихся в этом же самом материале. Таким образом, только способность

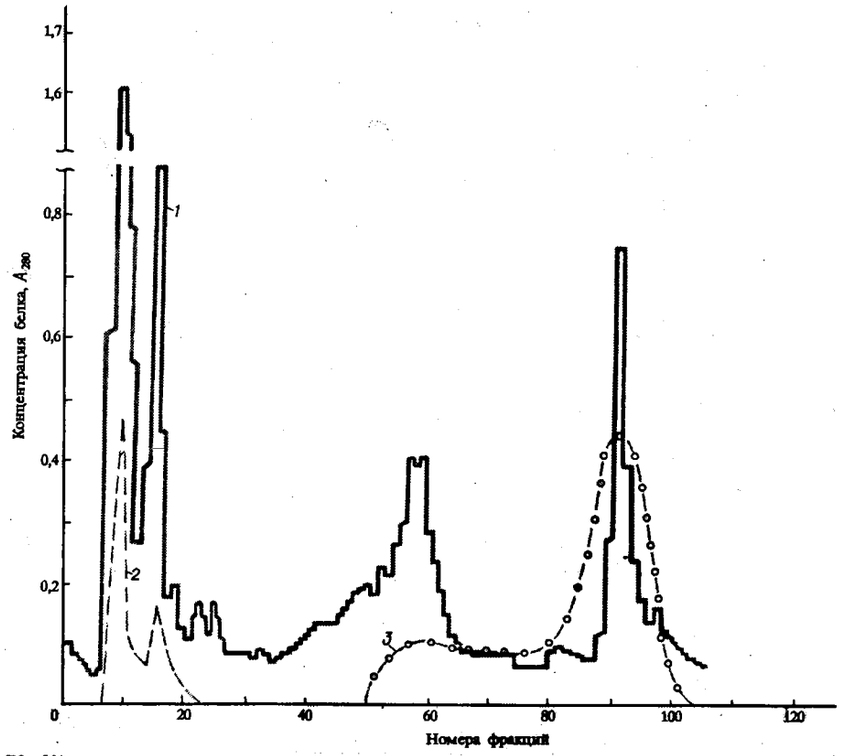


Рис. 70. Хроматограмма яда среднеазиатской гюрзы:

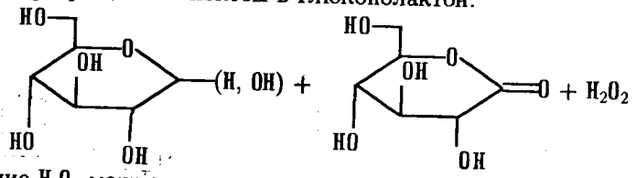
1 – концентрация белка (УФ-поглощение при 280 нм); *2* – активность фосфодиэстеразы; *3* – активность 5′-нуклеотидазы (по данным Г.Т. Бабкиной, С.К. Василенко)

катализировать определенную ферментативную реакцию может служить доказательством присутствия фермента в анализируемом образце. Естественно, этот критерий необходимо использовать с осторожностью, так как в образце может присутствовать ряд ингибиторов или могут отсутствовать активаторы, необходимые для проявления ферментативной активности. В этом случае необходимо искать дополнительные тесты. Существенным преимуществом определения ферментативной активности является чувствительность этого метода, так как каждая молекула фермента способна превратить в продукты тысячи и даже миллионы молекул субстрата. Например, в начале этого параграфа показано, что в кювете объемом 1 мм^3 можно зарегистрировать 10^{-12} моль NAD·H. Таким образом исследуемый фермент, если он катализирует окисление определенного органического вещества с помощью NAD^+ с каталитической константой порядка 10^3 с$^{-1}$, за полчаса (т.е. за 1800 с) способен накопить необходимое количество NAD·H при наличии порядка 10^{-18} моль фермента в образце. Для фермента с молекулярной массой 10^5 это означает возможность регистрации 10^{-13}, или 0,1 пкг, фермента.

В качестве примера на рис. 70 представлен профиль элюции ионообменной хроматографии змеиного яда из *Vipera lebetina* (гюрзы). Как и все змеиные яды, он представляет собой сложную смесь белков. Профиль элюции белка получали измеряя оптическую плотность при 280 нм, характерную для белков, так

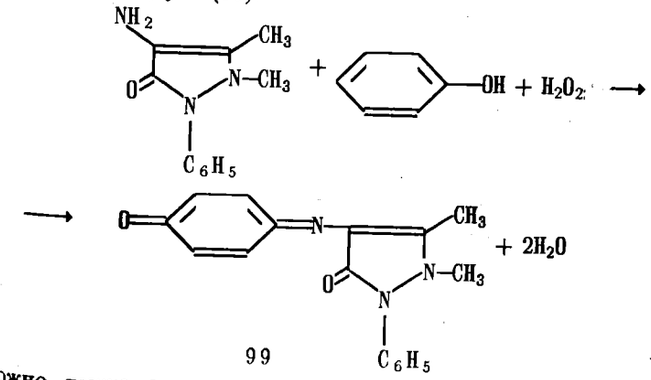
как триптофановые остатки являются основными фрагментами, отвечающими за УФ-поглощение. Параллельно измерялась активность двух ферментов во всех фракциях. Активность фосфодиэстеразы змеиного яда, катализирующей отщепление 3′-концевых нуклеотидов от нуклеиновых кислот, определялась по количеству окрашенного в желтый цвет *n*-нитрофенолята, отщепившегося от Са-бис *n*-нитрофенилфосфата, который является субстратом фосфодиэстеразы. Другой фермент, 5′-нуклеотидаза, катализируя отщепление неорганического фосфата от нуклеозид 5′-фосфатов, приводит к накоплению фосфата, количество которого легко определяется по интенсивности сине-фиолетового окрашивания, возникающего при добавлении раствора молибдата аммония в 5 н. серной кислоте.

С другой стороны, ферменты открывают возможность анализировать с высоким уровнем специфичности присутствие определенных соединений в биологических образцах. В специальных книгах, посвященных проблемам медицинской биохимии, можно найти ряд важных биохимических критериев, необходимых для диагностических целей, в первую очередь анализов крови. В качестве примера можно привести ферментативное определение глюкозы. Содержание глюкозы в крови является важным показателем состояния организма, особенно в случае диабета. Основная задача заключается в том, чтобы отличить глюкозу от других моносахаридов и превратить ее в производное, легко определяемое фотометрически. Одна из наиболее распространенных систем состоит из двух ферментов: глюкозооксидазы и пероксидазы из хрена. Первый, будучи флавопротеином, катализирует превращение глюкозы в глюконолактон:



(VII.5)

Наличие H_2O_2 можно легко регистрировать с помощью катализируемой пероксидазой реакции с некоторыми органическими веществами, которые, окисляясь H_2O_2, дают окрашенные продукты. Например, в качестве субстрата пероксидазы широко используется смесь 4-аминоантипирина и фенола, которые образуют оранжево окрашенный аддукт (99):



(VII.6)

99

Можно также определить содержание пероксида водорода по интенсивности хемилюминесценции, возникающей в результате описанной выше реакции при добавлении люминола.

В этих случаях, очевидно, не происходит увеличение количества конечного детектируемого вещества или аддукта и чувствительность метода не превышает традиционные методы. В то же время использование фермента, строго специфичного для β-D-глюкозы, делает определение весьма селективным.

В заключение следует сказать, что сейчас активно развивается новая область биохимического анализа — трансформация результатов биохимического процесса в физический ответ с помощью соответствующих специальных устройств. Подобные устройства называют *биосенсорами*. Например, ответом на определенное биохимическое событие может быть изменение потенциала некоторого электрода. Так, углеродный электрод, покрытый пероксидазой, может посылать электроны к H_2O_2, который восстанавливается в соответствии с уравнением

$$H_2O_2 + 2\bar{e} + 2H^+ \longrightarrow 2H_2O$$

Процесс сопровождается существенным изменением потенциала, которое легко можно измерить и соотнести с концентрацией H_2O_2. Следовательно, если подобный электрод обработать и глюкозооксидазой и пероксидазой вместе, то он будет «отвечать» на присутствие глюкозы, так как последняя будет окисляться кислородом, давая H_2O_2 в соответствии с уравнением (IV.3).

Возможно использование и других типов физических ответов. Например, для реакций, сопровождающихся образованием или расходованием O_2, могут быть сконструированы оптические биосенсоры. В качестве примера такого сенсора может служить концевая часть оптического волокна, покрытая двойной пленкой, состоящей из флуоресцирующего порфиринового красителя, заплавленного в полистирол, и соответствующей оксидазы, например глюкозооксидазы. По оптическому волокну к исследуемому образцу, в который погружен биосенсор, подводится возбуждающее излучение и по нему же отводится к флуориметру испускаемое излучение. Интенсивность флуоресценции порфирина понижается в присутствии O_2, и таким образом, может быть соотнесена с концентрацией O_2 в слое, находящемся в непосредственном контакте с биосенсором. Расход O_2, обусловленный присутствием окисляемого соединения, приводит к уменьшению концентрации O_2 в слое, прилегающем к пленке, содержащей порфирин, воздействуя таким образом на интенсивность флуоресценции.

7.4. ИММУНОАНАЛИЗ

Иммуноглобулины из-за своей поразительной специфичности стали исключительно важным инструментом биохимического анализа. Методы, основанные на образовании комплексов антител с антигенами или гаптенами, называют *иммуноанализом*. Иммуноанализ используется либо для определения определенных антигенов с помощью специфических к этим антигенам антител, либо, наоборот, для детекции антител определенной специфичности с помощью соответствующих антигенов. И та, и другая задача имеет широкий спектр применений в фундаментальных биохимических исследованиях, в биотехнологии, в медицинской практике и для оценки состояния окружающей среды.

Выявление присутствия определенных антител в живом организме имеет прежде всего значение для решения ряда медицинских задач. Присутствие антител к определенным вирусам или микроорганизмам и их количество являются важным критерием наличия или, наоборот, отсутствия у организма иммунитета к соответствующим заболеваниям, свидетельствует о присутствии в организме соответствующего возбудителя заболевания. Например, наличие в сыворотке крови некоторых людей антител к возбудителю СПИДа, вирусу ВИЧ-1, указывает на заражение человека приобретенным синдромом иммунодефицита, что является первым сигналом об инфицировании данного человека задолго до того, как появятся клинические симптомы СПИДа.

Чрезвычайно широкий спектр применений имеет иммуноанализ для определения как самого факта присутствия, так и измерения количества антигенов, в том числе гаптенов, т.е. низкомолекулярных соединений, к которым можно получить антитела, как правило, путем иммунизации животных конъюгатом гаптена с высокомолекулярным носителем, способным вызывать иммунный ответ. Иммуноанализ нашел широкое применение для анализа содержания различных гормонов, что имеет огромное значение для оценки состояния эндокринной системы человека и животных. Важное значение для оценки состояния окружающей среды, в первую очередь качества питьевой воды и пищевых продуктов, приобретает иммуноанализ содержания пестицидов. В связи с интенсивным развитием гибридомной техники для анализа определенных антигенов все более широкое применение находят моноклональные антитела.

Во всех случаях иммуноанализа первичной задачей является превращение анализируемого объекта в комплекс антиген — антитело с определением его количества. При больших количествах исходного материала и достаточно высоком содержании в нем подлежащего определению антигена или антитела можно воспользоваться тем, что образование комплекса антиген — антитело часто сопровождается его осаждением (преципитацией). В этом случае образование комплекса можно зарегистрировать по помутнению раствора (турбидиметрически). Однако развитие иммуноанализа все более смещается в область анализа малых количеств веществ, так что становится чрезвычайно актуальной чувствительность методов определения. Это достигается введением специальных меток в один из компонентов, участвующих в образовании специфического комплекса антиген — антитело. Для этой цели широко используют радиоактивные метки. Соответствующий метод называют *радиоиммуноанализом*. В последние десятилетия наблюдается тенденция замены радиоиммуноанализа нерадиохимическими методами детекции. Среди них наиболее широко используется *иммуноферментный* анализ. Он базируется на конъюгации одного из компонентов с определенным ферментом, который можно определить с очень высокой чувствительностью. Последняя достигается в результате образования огромного числа молекул продукта на каждую молекулу фермента. Одним из широко используемых с этой целью ферментов является рассмотренная в § 7.3 пероксидаза. Будучи конъюгирована с одним из компонентов специфического комплекса, она позволяет легко определить содержание конъюгированного с ней компонента либо по окрашиванию продукта, возникающего при добавлении H_2O_2 и окисляемого органического субстрата, либо по интенсивности хемилюминесценции в смеси H_2O_2 с люминолом. Широко используется также щелочная фосфатаза из кишечника теленка. В качестве субстрата в этом случае используют 5-Br-4-Cl-3-индолилфосфат, который при отщеплении фосфата дает характерное окрашивание.

Существует несколько версий проведения иммуноанализа. Наиболее очевидным является применение прямого количественного иммуноанализа, при котором анализируемое вещество должно практически полностью перейти в комплекс.

Метка при этом должна содержаться в том компоненте, который образует комплекс с анализируемым веществом. Например, для анализа определенного антигена нужно располагать антителом, специфичным к этому антигену, ввести в него метку (радиоактивную, ферментную, люминесцентную и т.д.) и количественно перевести анализируемое вещество в комплекс. Для того чтобы достичь максимального уровня этого перехода, меченое антитело нужно брать в избытке. Но тогда нужно предусмотреть процедуру отделения комплекса от избытка меченого антитела. Для этих целей используют иммобилизацию анализируемого компонента на твердой поверхности. В этом случае комплекс антиген — антитело остается на поверхности, тогда как избыток меченого антитела, не вошедший в состав комплекса, легко удаляется.

Широко распространенная версия иммуноанализа базируется на введении метки во вспомогательный белок, обладающий сродством к комплексу антиген — антитело. В этом случае детектируется трехкомпонентный комплекс антиген — антитело — меченый вспомогательный белок. Такой комплекс часто называют *сэндвичем*. Одна из наиболее широко используемых систем такого рода основана на использовании витамина биотина. Биотин описан в § 4.6, и его основная биологическая функция состоит в участии в качестве кофактора в ферментах, катализирующих реакции карбоксилирования, однако наряду с этим он обладает уникальным сродством к белку *авидину*, содержащемуся в яичном желтке, и к его бактериальному аналогу *стрептавидину*. Оба эти белка являются тетрамерами, состоящими из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых обладает активным центром для связывания биотина. Биотин может быть легко введен в антитело путем реакции его карбоксильной группы с какой-либо аминогруппой антитела. Далее для определения комплекса антиген — антитело можно использовать авидин в качестве носителя чувствительной метки, например конъюгат авидина с пероксидазой.

При анализе содержания в образце антител определенной специфичности можно использовать так называемый белок А из стафилококка, который обладает специфическим сродством к константной части антител в комплексе с их антигенами или гаптенами. Образование комплекса антиген — антитело регистрируется после удаления избытка антитела по взаимодействию конъюгата белка А с детектируемой меткой, например пероксидазой.

Для того чтобы продемонстрировать принцип иммуноферментного анализа, приведем результаты анализа иммуноглобулина, специфичного к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) в сыворотке крови пациентов. Этот показатель является очень важным как минимум по двум аспектам. Применительно к человеку, укушенному клещом, результат анализа показывает, достаточно ли устойчив человек к энцефалиту. А в случае использования крови здоровых доноров этот показатель свидетельствует о том, содержит ли кровь достаточное количество антивирусных антител, для того чтобы быть использованной для приготовления антивирусного иммуноглобулина. Последний может быть использован для введения человеку, укушенному клещом, для предотвращения развития инфекции. Известно, что поверхностный вирусный белок Е является основным антигеном ВКЭ. Этот белок можно достаточно прочно сорбировать на поверхности полистирольной пробирки. Если взять его в избытке, достаточном для количественного связывания антител к белку Е в образце, последние будут сорбированы практически полностью. После удаления образца добавляется конъюгат стафилококкового

белка А с пероксидазой хрена, количество которой определяется по окрашиванию, возникающему при добавлении смеси 4-аминоантипирина и фенола. Этот анализ является типичным примером использования конструкции сэндвича, которая в этом случае состоит из антигена, специфического антитела и вспомогательного белка А, несущего метку. Меченый компонент, предназначенный для иммунохимического анализа, можно также использовать в конкурентном варианте. В этом случае метка вводится в определяемый антиген. Меченый антиген добавляется к образцу и, следовательно, разбавляется немеченым антигеном, присутствующим в этом образце. Степень разбавления указывает на количество антигена в образце. В качестве примера можно привести анализ миоглобина. Этот белок находится в мышцах, включая и сердечную мышцу, и играет роль депо кислорода. Сердечная мышца повреждается во время инфаркта, и миоглобин попадает в кровяное русло. Определение количества миоглобина в крови может служить указанием на инфаркт миокарда, а измерение этого количества через определенные промежутки времени позволяет следить за течением заболевания. Один из эффективных методов такого определения был разработан на основе миоглобина, меченного ^{125}I, путем обработки белка иодированным реагентом Болтон — Хантера

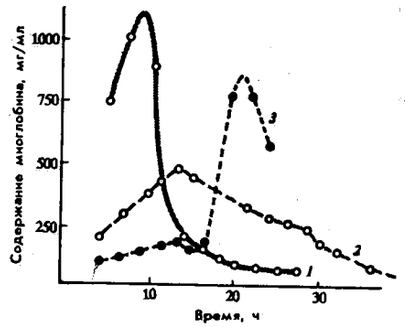
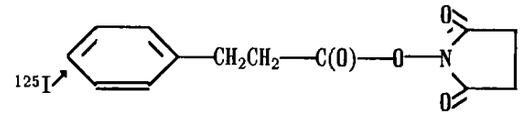


Рис. 71. Изменение концентрации миоглобина в сыворотке крови больного при инфаркте миокарда. Существенное повышение уровня миоглобина начинается через 3–4 ч от начала приступа (кривые *1* и *2*). Вторичный приступ вызывает повторное повышение уровня миоглобина (кривая *3*) (по данным В.В. Рошке с соавт.)



100

который ацилирует лизиновые ϵ-аминогруппы белка. Добавление к анализируемому образцу крови пациента приводило к разбавлению тем более сильному, чем больше было количество миоглобина в образце. По завершении образования комплекса миоглобина и его радиоактивного производного к пробе добавляли в ненасыщающих количествах антитела к миоглобину, что приводило к осаждению лишь части миоглобина, причем как нативного, так и меченого. Очевидно, что чем больше миоглобина было в анализируемом образце, тем меньшая доля от всего миоглобина, а следовательно, и тем меньшее количество радиоактивного материала попадало в выпавший осадок. Определение радиоактивности осадка позволяло с помощью заранее построенных калибровочных кривых определить содержание миоглобина в пробах и проследить за накоплением миоглобина у пациента с предполагаемым инфарктом. На рис. 71 представлены результаты подобного анализа во время развития инфаркта. В этом случае отчетливо наблюдались две стадии развития болезни.

7.5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Подобно тому, как в иммунохимических методах наличие определенного антигена в анализируемом образце определяется по взаимодействию с антителом, специфичным к этому антигену, присутствие в образце, содержащем нуклеиновые кислоты, определенной нуклеотидной последовательности может быть зарегистрировано с помощью олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты, комплементарных анализируемой последовательности, путем регистрации образовывания дуплекса. Соответствующие нуклеиновые кислоты или олигонуклеотиды обычно называют *олигонуклеотидными зондами* или полинуклеотидными зондами (*ДНК-зонды* или *РНК-зонды*). Метод анализа, основанный на гибридизации с такими зондами, называют *гибридизационным анализом*. Анализируемый образец может быть закреплен на какой-либо подложке или иммобилизован в геле. Последняя ситуация довольно типична для нуклеиновых кислот, если анализируемая смесь подвергалась гель-электрофорезу. Иммобилизованный образец может быть обработан соответствующим зондом, несущим какую-нибудь метку, которая после удаления избытка зонда позволяет с высокой чувствительностью зарегистрировать образование дуплекса. Олигонуклеотидные зонды получают синтетически (см. § 7.10). ДНК-зонды могут быть получены с помощью генетической инженерии с использованием методов, описываемых в § 7.11. Одним из наиболее эффективных путей является введение комплементарного ДНК-фрагмента в бактериофаг, содержащий одноцепочечную ДНК, например мутантный бактериофаг M13, несущий требуемую вставку. Путем размножения такого фага в клетках хозяина можно накопить его в значительном количестве. Если для детекции предполагается использовать радиоактивные зонды, то их нетрудно получить размножением фага в среде, содержащей [^{32}P]-ортофосфат.

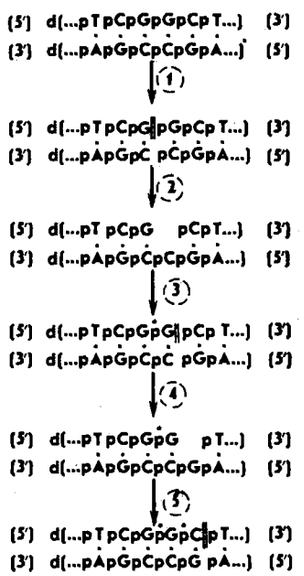


Рис. 72. Схема введения радиоактивной метки с помощью ник-трансляции. Две вертикальные черты обозначают разрыв с образованием 3′-OH и 5′-концевого фосфата (ник.):
1 – образование ника действием ДНКазы I; *2* – выщепление pG под действием ДНК-полимеразы I; *3* – застройка бреши радиоактивным фрагментом p*dG; с помощью ДНК-полимеразы I и ppp*dG; *4* – выщепление следующего (pC) фрагмента; *5* – застройка бреши с помощью ppp*dC

Методы генной инженерии позволяют ввести ДНК-зонд в виде соответствующего двунитевого фрагмента в плазмиду. Эти плазмиды после размножения внутри бактериальных клеток можно использовать непосредственно в качестве зондов, так как, будучи расплавлены, такие плазмиды не полностью ренатурируют и содержат требуемые однонитевые фрагменты. Их также можно «вырезать» из плазмиды, используя специфические ферменты рестрикции (см. § 7.6), и пометить, используя различные химические и биохимические методы.

Одним из наиболее распространенных методов для подобных целей является *ник-трансляция*, позволяющая ввести как высокорадиоактивные метки, так и метки для нерадиоактивного анализа. На рис. 72 представлена схема радиоактивного мечения двунитевой ДНК с помощью ник-трансляции. Двуцепочечная немеченая ДНК, одна из цепей которой должна служить зондом, обрабатывается ферментом ДНКазой I, которая вызывает разрывы в дуплексной структуре с образованием 3′-OH-группы на одном конце разрыва и 5′-фосфат — на другом конце. Такие разрывы называют никами. Затем такая ДНК обрабатывается ДНК-полимеразой I из *Escherichia coli* в присутствии одного или всех четырех [α-^{32}P]-дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов. Из-за присущей ферменту 5′-3′-экзонуклеазной активности (см. § 5.4) фермент последовательно отщепляет 5′-концевые нуклеотиды в точках разрывов, а образующаяся брешь немедленно застраивается в результате ДНК-полимеразной активности. При этом радиоактивные нуклеотидные остатки присоединяются по 3′-OH-группам бреши. Многократное повторение подобных событий приводит к замещению значительной части нерадиоактивных остатков радиоактивными, давая таким образом высокомеченый зонд. Ники в ходе этой операции сохраняются, но могут быть легко устранены с помощью ДНК-лигазы. РНК-зонды с высокой радиоактивностью могут быть получены путем транскрипции соответствующей двунитевой ДНК в присутствии меченых в α-положении рибонуклеозид-5′-фосфатов.

Как и в иммуноанализе, в гибридизационном анализе в настоящее время интенсивно развиваются подходы к нерадиохимической детекции, в первую очередь на основе использования ферментов. С этой целью можно либо использовать зонды, содержащие ковалентно присоединенный фермент, либо ввести в зонд какие-либо группы, способные взаимодействовать с вспомогательным белком, конъюгированным с ферментом.

Существует ряд методов, позволяющих ковалентно связать фермент с олигонуклеотидным зондом. В качестве примера можно рассмотреть получение конъюгата олигонуклеотида-зонда с щелочной фосфатазой из кишечника теленка, уже упоминавшейся при описании иммуноферментного анализа. Из олигонуклеотида нетрудно получить производное

$$\text{олигонуклеотид—P(O)(O}^-\text{)—NH(CH}_2\text{)}_2\text{NHC(O)(CH}_2\text{)}_2\text{SH}$$

с 3′-концевой SH-группой. В щелочную фосфатазу можно ввести некоторое число бромацетильных остатков путем ацилирования части ε-аминогрупп боковых радикалов лизина активированным производным бромуксусной кислоты, например ее ангидридом. Алкилирование SH-группы зонда бромацетильным остатком фермента приводит к конъюгату:

$$\text{олигонуклеотид—P(O)(O}^-\text{)—NH(CH}_2\text{)}_2\text{NH—C(O)(CH}_2\text{)}_2\text{—S—CH}_2\text{C(O)—фермент}$$

В качестве иллюстрации применения гибридизационного анализа с помощью такого конъюгата можно привести результаты анализа серии бактериальных штаммов на способность продуцировать энтеротоксин. При этом в качестве зондов использовали

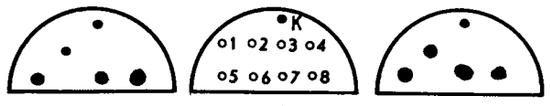
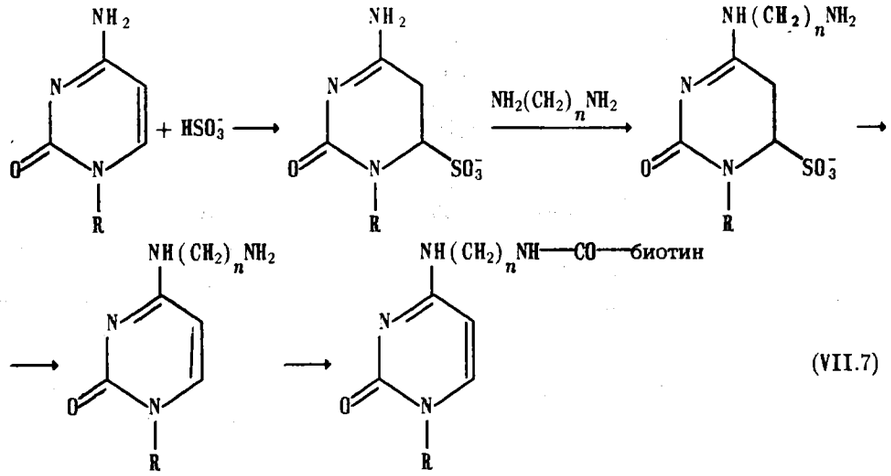


Рис. 73. Детекция методом молекулярной гибридизации наличия в фекалиях пациентов патогенного штамма *E.coli*, несущего ген энтеротоксина:
а – радиохимический анализ; *б* – схема нанесения образцов (1–8) и контроля (К); *в* – ферментативный анализ

олигонуклеотиды, комплементарные к определенным областям бактериальной ДНК, кодирующей энтеротоксин. Образцы ДНК выделялись из бактериальных штаммов, которые предполагалось исследовать на содержание гена энтеротоксина, и иммобилизовались на нитроцеллюлозных фильтрах. Те из них, которые содержали ген токсина, при обработке конъюгатом зонд–фермент гибридизовались с конъюгатом и могли быть легко идентифицированы путем добавления 5-Br-4-Cl-3-индолилфосфата по появлению на фильтре характерного окрашивания. Полученные результаты как радиоактивного, так и ферментативного определения, представленные на рис. 73, четко демонстрируют, что патогенный штамм присутствует в образцах, обозначенных номерами 2, 5, 7, 8.

Для использования сэндвич-гибридизации в зонд нужно ввести специальные группы, обладающие высоким сродством к вспомогательному белку, несущему метку. Как и в иммуноферментном анализе, с этой целью часто используют биотин. Его легко присоединить к олигонуклеотидам или ввести в молекулу ДНК мягкой обработкой зонда. Например, небольшое число цитозиновых остатков можно превратить в производные, несущие алифатическую аминогруппу. С этой целью зонд обрабатывается этилендиамином или гексаметилендиамином в присутствии бисульфита натрия в соответствии с реакцией



(VII.7)

Последующая обработка N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина приводит к образованию биотинилированной ДНК. При такой модификации у цитозина сохраняется один N—H-фрагмент, способный к образованию уотсон-криковских пар с комплементарными гуанинами, хотя эта их способность существенно понижается. Тем не менее при низкой степени модификации и достаточно длинном зонде гибридизационная способность остается высокой. Биотинилированную ДНК в составе дуплекса, образованного зондом с мишенью, можно определить используя конъюгат стрептавидина с пероксидазой, фосфатазой или каким-либо другим ферментом.

Наряду с ферментами в гибридизационном анализе нередко применяют введение в зонд каких-либо гаптенов, например динитрофенильных остатков. В этом случае образовавшийся дуплекс можно зарегистрировать с помощью антител, специфичных к гаптену и конъюгированных с ферментом.

Огромным достоинством гибридизационного анализа является возможность резко повысить его чувствительность, используя способность нуклеиновых кислот к самокопированию, приводящему к существенному увеличению числа анализируемых молекул. Этот прием известен под названием *амплификации*. Если речь идет об определении нуклеиновой кислоты известного строения, то содержание фрагмента этой ДНК длиной в несколько сотен пар нуклеотидов в исследуемом образце можно резко увеличить с помощью ДНК-полимеразы. С этой целью к образцу добавляют синтетические праймеры, комплементарные 3′-концам обеих нитей амплифицируемого участка ДНК, выбранных для репликации. В такой системе в присутствии дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов и ДНК-полимеразы происходит репликация ДНК, причем именно той, для которой выбраны праймеры. В результате репликации появляются две новые копии с выбранными праймерами на 5′-концах. Процесс может быть продолжен, для чего необходимо расплавить сформировавшийся дуплекс и добавить новую порцию праймера, если он исчерпался. Последующее снижение температуры до уровня, позволяющего образование дуплекса матрица — праймер, позволяет осуществить следующий цикл репликации. Легко подсчитать, что теоретически достаточно 20 циклов, чтобы достичь увеличения количества ДНК в 10^6 раз. Так как ДНК-полимераза при нагревании может инактивироваться, то предпочтительно использовать специальные ферменты из термофильных организмов. В настоящее время наиболее широко применяется ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза). В этом случае фермент выдерживает нагревание вплоть до температуры плавления и нет необходимости добавлять новые порции фермента после каждого цикла амплификации. Описанную процедуру называют *цепной полимеразной реакцией* или сокращенно ПЦР (от англ. polymerase chain reaction-PCR). Она позволяет повысить в миллионы раз чувствительность, открывая таким образом возможность детектирования небольшого числа полинуклеотидных цепей, например несколько частиц вируса СПИДа в исследуемой крови. Гибридизационный анализ образцов, предварительно амплифицированных с помощью ПЦР, открывает перспективу ранней пренатальной диагностики наличия дефектного гена у плода, используя в качестве анализируемого материала небольшое число клеток околоплодной жидкости. На рис. 74 представлена принципиальная схема нескольких первых стадий процесса амплификации. Аналогичным образом можно анализировать РНК, если предварительно провести обратную транскрипцию.

Наиболее простым способом гибридизации является проведение ее с образцом, нанесенным в виде пятна на некоторую подложку (*дот-гибридизация*, от англ. dot — пятно). Этот тип гибридизации фактически уже описывался на примере анализа на содержание гена энтеротоксина. Разрешающая сила метода повышается, если анализируемый образец предварительно подвергнуть гель-электрофорезу. В этом случае полезно перенести материал с геля на более удобный для проведения гибридизации материал, приведя гель в контакт с целлюлозным или нейлоновым фильтром. Добавление меченых зондов позволяет обнаружить полосы, несущие определяемые последовательности. Этот метод известен как *гибридизация по Саузерну*.

Одним из широко используемых применений гибридизации по Саузерну является метод, известный под названием RFLP (Resrtiction Fragment Length Polymorphism). В этом методе анализируемый образец ДНК подвергается обработке специфическими эндонуклеазами рестрикции (см. § 7.8), которые разрезают иссле-

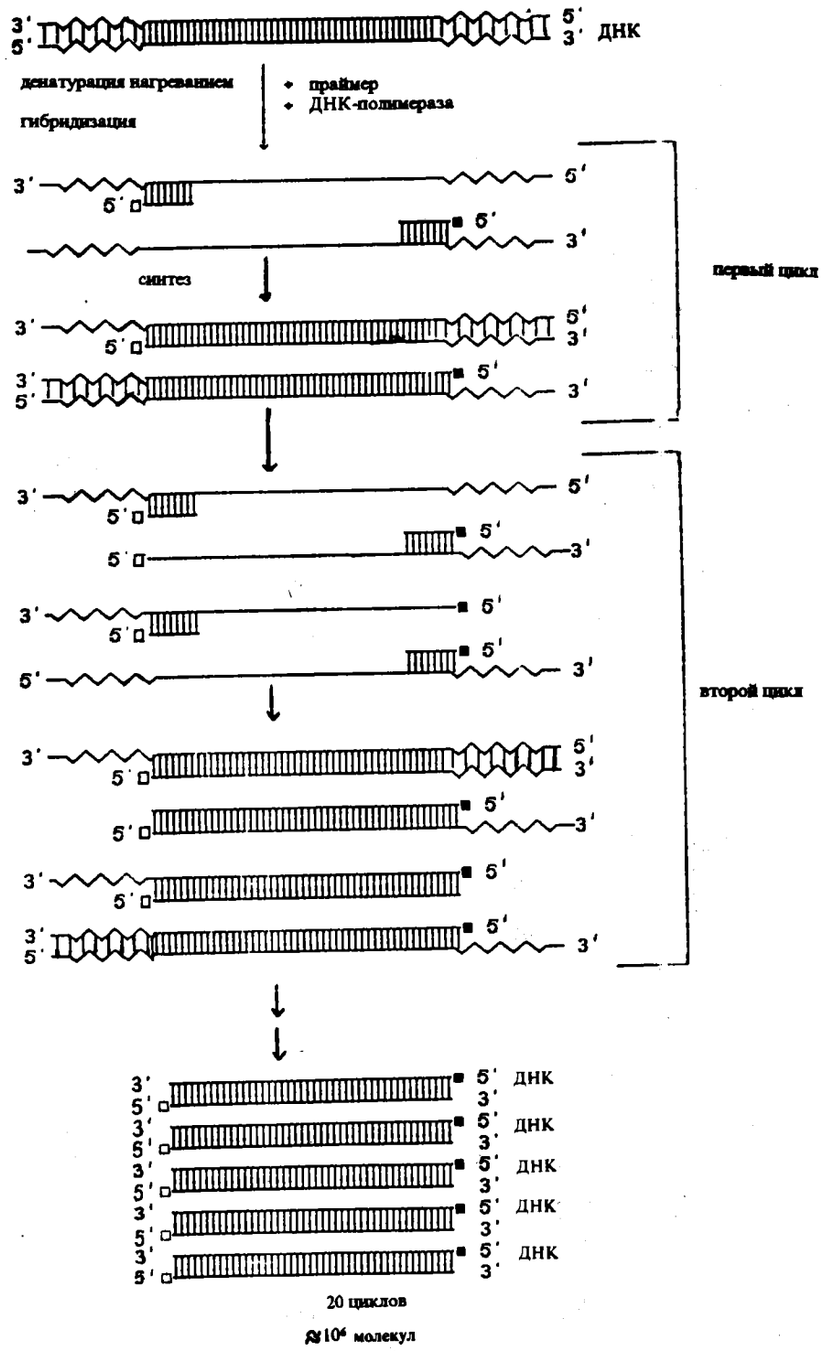


Рис. 74. Принципиальная схема первых стадий процесса амплификации

дуемую ДНК по определенным точкам. После электрофореза и Саузерн-гибридизации получается характерное расположение полос, гибридизующихся с некоторым определенным зондом. Это расположение строго индивидуально для каждой ДНК, поскольку при изменении в какой-либо точке последовательности, узнаваемой соответствующей эндонуклеазой, размеры некоторых из фрагментов, а следовательно, и расположение полос изменяются. Это может быть использовано для идентификации людей в криминальных ситуациях, по оставленным ничтожным следам какого-либо биологического материала. Метод также полезен для выявления патологических генных мутаций.

Следует отметить, что в случаях, не требующих сверхвысокой чувствительности, ПЦР может быть использована для того, чтобы определять наличие определенных нуклеотидных последовательностей в образце без последующей гибридизации. Появление полосы определенной длины в полиакриламидном геле при электрофорезе после того, как образец был подвергнут ПЦР с определенной парой праймеров, надежно указывает на то, что выбранная последовательность действительно присутствует в образце.

Значение ПЦР не ограничивается ее применением в гибридизационном анализе. ПЦР можно использовать и в препаративных целях для накопления достаточного количества материала для различных научных и прикладных задач, например для получения достаточного количества ДНК-зондов.

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БИОПОЛИМЕРА

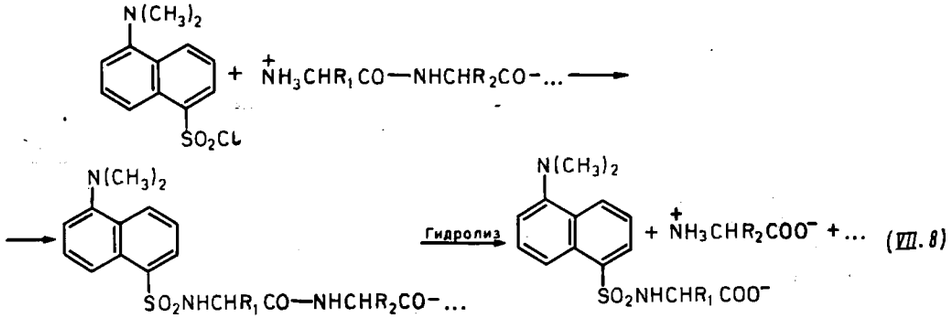
Существенный этап в исследовании биополимеров — определение их молекулярной массы. В отличие от химии высокомолекулярных соединений, имеющей в основном дело с полидисперсными системами и поэтому оперирующей со средними значениями молекулярных масс, биохимию в части, касающейся белков и нуклеиновых кислот, в первую очередь интересует молекулярная масса индивидуальных объектов.

Очевидно, что наиболее точным методом определения молекулярной массы индивидуального белка или нуклеиновой кислоты является установление их первичной структуры, после чего молекулярную массу получают простым суммированием ее значений для отдельных мономерных звеньев. Поскольку на сегодняшнем уровне биохимии установление первичной структуры практически всегда является одной из основных целей исчерпывающего изучения биополимера, остальные методы определения молекулярной массы применяются в основном на промежуточных этапах исследования, а также в тех случаях, когда биополимер не удается получить в виде индивидуального, пригодного для детальных структурных исследований вещества. В этом параграфе речь будет идти именно о таких приближенных методах, используемых на первой фазе изучения биополимера.

На ранних этапах развития биохимии белков и нуклеиновых кислот важное значение имели абсолютные методы определения молекулярной массы, т.е. методы, не привлекающие данных, полученных на других аналогичных объектах. В настоящее время, когда в распоряжении исследователей имеется огромный материал по молекулярным массам самых разнообразных белков и нуклеиновых кислот, широкое применение нашли относительные методы, основанные на сопоставлении каких-либо легко доступных измерению зависящих от молекулярной мас-

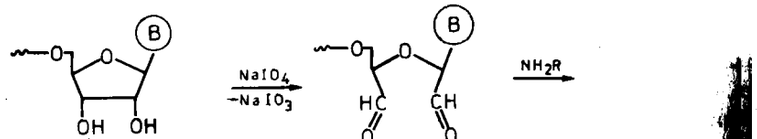
сы характеристик исследуемого объекта с данными для биополимеров с уже известной молекулярной массой.

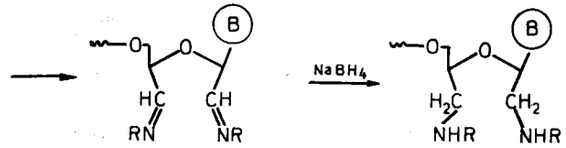
Среди абсолютных методов удобным и в ряде случаев несложным является *метод концевого анализа*. Как в белках, так и в нуклеиновых кислотах на концах имеются группы, существенно отличающиеся по своим свойствам от соответствующих групп внутренних остатков. Если провести по одной из этих групп химическое или биохимическое (т.е. катализированное каким-либо ферментом) превращение, позволяющее количественно ввести в нее некоторую метку — спектральную, флуоресцентную или радиоактивную, то тем самым можно определить число концевых групп, т.е. число молекул биополимера в образце. Зная одновременную массу исследуемого образца, нетрудно отсюда найти молекулярную массу. В белках для концевого анализа используют динитрофенильную группу, которую вводят по уникальной концевой α-аминогруппе обработкой динитрофторбензолом. Введенная метка устойчива в условиях полного расщепления белка до аминокислот. Лишенная положительно заряженной в кислой и нейтральной среде α-аминогруппы динитрофениламинокислота может быть легко отделена от остальных α-аминокислот, образовавшихся при гидролизе полипептидной цепи, а ее количество может быть измерено по характерному для динитрофенильных производных УФ-поглощению при 360 нм. Аналогично может быть использована реакция с 5-N,N-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлоридом (сокращенно *дансилхлоридом*), приводящая к превращению концевой аминокислоты в дансильное производное, которое может быть с высокой чувствительностью зарегистрировано по характерной флуоресценции при облучении УФ-светом с $\lambda = 254$ нм:



(VII.8)

Для рибонуклеиновых кислот характерной является *цис*-диольная группа на 3′-конце олиго- или полинуклеотида. Добавление периодата натрия приводит к окислению ее до двух альдегидных групп, а последующее взаимодействие с аминами — к образованию оснований Шиффа. Последние могут быть восстановлены до стабильных алкиламинов с помощью боргидрида натрия. Все реакции протекают в водном растворе при комнатной температуре и нейтральном pH, т.е. в условиях сохранности полирибонуклеотидной цепи. Последовательность превращений может быть записана в виде



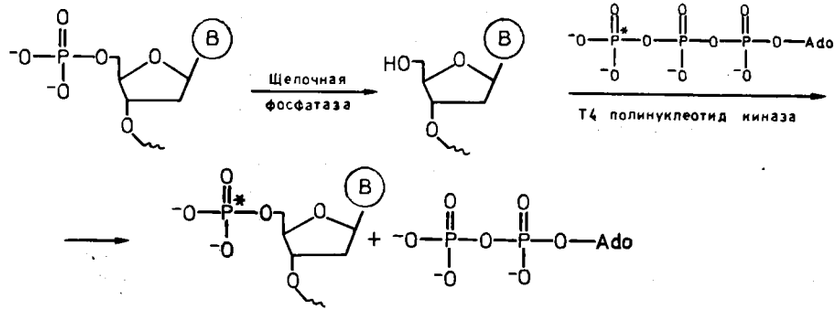


(VII.9)

где B — любой гетероцикл.

Если радикал R содержит спектроскопическую, поглощающую вне области поглощения РНК (т.е. при $\lambda > 300$ нм), флуоресцирующую или радиактивную метку, то процедура позволяет определить молярную концентрацию концевых групп, т.е. общее число молекул РНК, а следовательно, и молекулярную массу.

Для ДНК концевая метка может быть введена ферментативным путем. Чаще всего для этой цели используют фермент *полинуклеотидкиназу*, специфически катализирующую перенос остатка фосфорной кислоты от молекулы АТФ к 5′-гидроксигруппе 5′-концевого фрагмента ДНК. Этот фрагмент производится в *E.coli*, зараженной бактериофагом T4, который содержит ген, программирующий синтез этого фермента. Если исходная ДНК содержит в 5′-положении остаток фосфорной кислоты, то его можно предварительно удалить с помощью другого фермента — *фосфомоноэстеразы* (щелочной фосфатазы), катализирующей отщепление ортофосфата от моноэфиров фосфорной кислоты. Чаще всего для этой цели используется фермент из *E.coli*. В целом схему введения 5′-концевой метки в ДНК можно представить следующим образом:



(VII.10)

(здесь P* — радиоактивная метка, ^{32}P или ^{33}P).

Существует несколько физических методов абсолютного измерения молекулярных масс, в первую очередь основанных на использовании седиментации или рэлеевского рассеяния света. Они требуют существенно большего количества индивидуального биополимера, чем описанные химические и биохимические методы, проводятся путем прецизионных измерений на дорогостоящем оборудовании и применительно к задаче измерения молекулярных масс белков и нуклеиновых кислот постепенно утрачивают свое значение. Седиментационные методы основаны на использовании уравнений (7.2) или (7.3). В первом случае измерению подлежат константа седиментации биополимера и коэффициент диффузии. Во втором случае нужно достичь состояния седиментационного равновесия и измерить распределение концентрации исследуемого биополимера вдоль центрифужной ячейки, т.е. концентрацию биополимера на нескольких разных расстояниях r от оси ротора. Оба метода требуют определения парциального удельного объема, или, что то же самое, плавучей плотности биополимера в условиях, используемых для седиментации.

Наиболее употребительные относительные методы основаны на измерении подвижности биополимеров в какой-либо системе зонального фракционирования. Для нативных белков используется гель-хроматография. Из-за гетерогенности пор в таких гелях в достаточно широком диапазоне молекулярных масс объем V_e, в котором выходит биополимер, возрастает с уменьшением молекулярной массы M, поскольку возрастает число пор, доступных для биополимера. При этом достаточно хорошо выполняется зависимость

$$V_e/V_0 = A - B\lg M, \tag{7.6}$$

где V_0 — внешний (свободный) объем геля; A и B — постоянные коэффициенты.

Проведя на колонке с гелем измерение V_e для нескольких белков с известной молекулярной массой, т.е. фактически осуществив градуировку колонки, можно определить V_e для исследуемого биополимера и путем интерполяции с помощью соотношения (7.6) найти его молекулярную массу. Существенно, что гель-хроматографию можно проводить в мягких условиях, сохраняя белок в нативном, функционально активном состоянии. Если в распоряжении экспериментатора имеется специфический тест на этот белок, пригодный для его выявления в смеси с другими белками, например определенная ферментативная активность, то определить молекулярную массу можно даже в неочищенном препарате белка, т.е. уже на промежуточных стадиях его очистки. Если полимер имеет четвертичную структуру, то, как правило, она сохраняется в условиях разделения и молекулярная масса представляет собой сумму масс составляющих белок субъединиц.

В качестве метода разделения для той же цели широко используют электрофорез в гелях. Для белков вследствие различий в их аминокислотном составе простой корреляции между молекулярной массой и подвижностью в электрофорезе не существует. Однако она может быть получена, если вести электрофорез в присутствии детергента. В биохимической практике для этой цели чаще всего используют додецилсульфат натрия $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ (sodium dodecyl sulfate, сокращенно SDS). При разделении в SDS-полиакриламидном геле происходит полная денатурация белковых молекул с выворачиванием наружу их гидрофобного ядра в результате захвата додецильных радикалов, в результате чего на поверхности образовавшегося агрегата появляется отрицательный заряд и он ведет себя в электрофорезе как полианион. Эксперимент показывает, что при этом в широком диапазоне выполняется линейная зависимость электрофоретической подвижности от логарифма молекулярной массы, которая после градуировки по белкам с известной молекулярной массой может быть использована для определения молекулярной массы исследуемого биополимера. В результате денатурации субъединичные белки диссоциируют на отдельные субъединицы, так что, во-первых, выявляется, из скольких разнотипных субъединиц состоит исследуемый белок, и, во-вторых, находится масса отдельных субъединиц.

Электрофорез в полиакриламидном геле также используется для оценки молекулярной массы нуклеиновых кислот. Применительно к таким огромным молекулам, каковыми являются даже простейшие ДНК, например ДНК не особенно крупных вирусов или митохондриальные ДНК, этот подход мало эффективен, но он широко применяется для оценки размеров фрагментов двунитевых ДНК, на которые их разрезают на первых этапах работы по установлению первичной структуры. Этот вопрос несколько подробнее рассмотрен в § 7.8.

7.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Белки и нуклеиновые кислоты при всем их неисчерпаемом многообразии построены из стандартных наборов соответствующих мономеров. Поэтому установление первичной структуры сводится преимущественно к выяснению, в каком порядке эти мономеры располагаются вдоль полипептидной или полинуклеотидной цепи. Эту задачу часто называют *секвенированием* (от англ. sequence — последовательность).

В отдельных случаях, естественно, исследователи сталкиваются с тем, что в составе исследуемого биополимера оказываются минорные компоненты неизвестного строения. В этом случае встает задача выделения этих компонентов и установления их строения методами органической химии, причем нередко приходится ограничиваться незначительным количеством материала, исключающим на первых порах применение таких высокоинформативных методов структурного анализа, как ядерный магнитный резонанс и рентгеноструктурный анализ. При последующем изложении будут рассматриваться методы, основанные на предположении, что подобные компоненты в секвенируемом биополимере отсутствуют.

Собственно секвенирование на его сегодняшнем уровне позволяет определить последовательность аминокислот в полипептидах, состоящих не более чем из нескольких десятков аминокислотных остатков, и определить в один прием последовательность для полинуклеотида, длина которого не превышает нескольких сотен мономеров. Существенно, что названные полимерные фрагменты значительно короче, чем те природные биополимерные молекулы, структура которых подлежит определению. Поэтому перед собственно процедурой секвенирования приходится разрезать исследуемый полимер на фрагменты определенной длины, достаточно короткие, чтобы их можно было подвергнуть секвенированию. Обычно речь идет о разрезании на значительное число фрагментов, которые должны быть разделены и очищены до индивидуального состояния. После того как каждый из них подвергнут секвенированию, следует восстановить структуру исходного биополимера, т.е. определить, в каком порядке набор фрагментов с уже установленной первичной структурой располагался в исходном биополимере.

Таким образом, определение последовательности мономерных фрагментов в биополимере разбивается на три главных этапа:

1) расщепление биополимера на несколько фрагментов, имеющих длину, доступную для используемых методов определения первичной структуры, и выделение этих фрагментов;

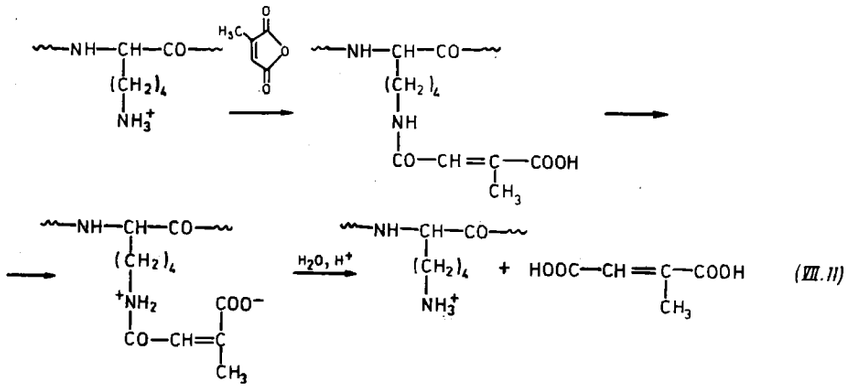
2) секвенирование каждого из полученных фрагментов;

3) сборка полной структуры биополимера из установленных структур его фрагментов.

Ниже последовательно рассматриваются важнейшие из используемых для этой цели подходов.

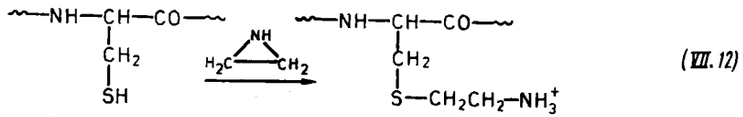
Для специфического расщепления белков по определенным точкам применяются как ферментативные, так и химические методы. Из ферментов, катализирующих гидролиз белков по определенным точкам, наиболее широко используют трипсин и химотрипсин. Трипсин специфично катализирует гидролиз пептидных связей, расположенных после положительно заряженных аминокислотных остатков — лизина и аргинина. Химотрипсин преимущественно расщепляет белки после остатков ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и трипто-

фана. Механизм действия этих двух ферментов и факторы, обеспечивающие указанную специфичность гидролиза, вкратце рассмотрены в § 6.1. В ряде случаев, особенно когда этих двух ферментов по тем или иным причинам оказывается недостаточно, привлекаются и другие протеазы. В необходимых случаях специфичность трипсина может быть повышена или изменена. Например, обработка цитраконовым ангидридом исследуемого белка приводит к ацилированию остатков лизина, которые в результате этого теряют положительный заряд. В таком модифицированном белке расщепление будет проходить только по остаткам аргинина, который при этой процедуре не модифицируется. Применение цитраконового ангидрида для ацилирования позволяет в дальнейшем, после разделения полученных полипептидов, отщепить цитраконовую кислоту мягким кислотным гидролизом. Этому способствует наличие вблизи образовавшейся амидной связи карбоксильной группы, способствующей легкому внутримолекулярному протонированию амидной группы, которое резко облегчает атаку амидной связи водой:



(VII.11)

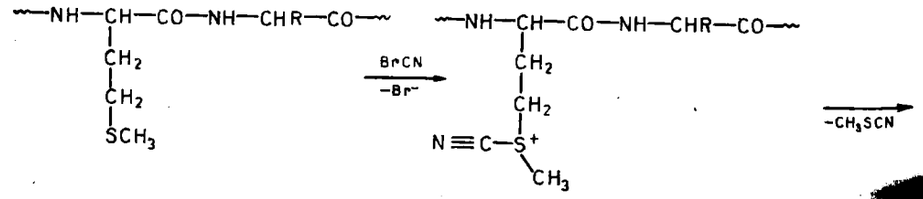
Наоборот, обработка исследуемого белка этиленимином приводит к модификации в нем остатков цистеина по реакции

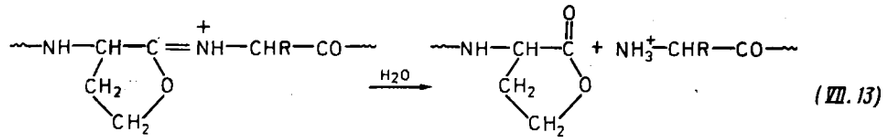


(VII.12)

в результате которой на этих остатках возникает положительно заряженная группа. Трипсин катализирует расщепление пептидных связей по заряженным аминоэтилцистеиновым остаткам.

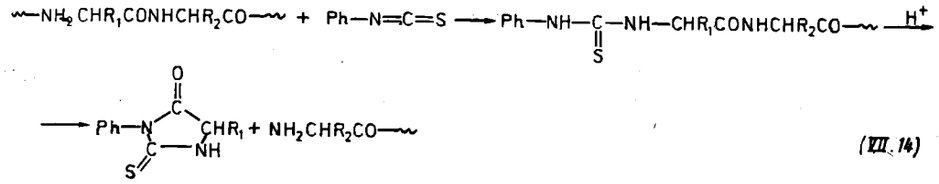
Наряду с ферментативными методами в практику белковой химии широко вошли химические методы расщепления по аминокислотным остаткам определенного типа. Среди них важнейшим является расщепление с помощью бромциана, которое проходит по остаткам метионина по схеме





(VII.13)

Секвенирование полипептидов проводят методом, известным как *метод Эдмана*. Последовательная обработка полипептида, имеющего свободную концевую α-аминогруппу, каким-либо алкил- или арилизотиоцианатом в слабощелочной среде приводит к образованию соответствующей тиомочевины, которая в умеренно кислой среде (при значениях кислотности, не повреждающих пептидные связи) отщепляется в виде соответствующего тиогидантоина. Оригинальная процедура Эдмана основана на использовании фенилизотиоцианата и тем самым на образовании фенилтиогидантоинов:



(VII.14)

В результате образуется фенилтиогидантоин, содержащий боковой радикал аминокислоты R_1, который может быть идентифицирован путем измерения какой-либо физической или физико-химической характеристики, позволяющей различать гидантоины, соответствующие разным входящим в состав белков аминокислотам. В качестве такой характеристики может служить хроматографическая подвижность в какой-либо предварительно проградуированной по стандартным образцам гидантоинов системе или молекулярная масса, определяемая с помощью масс-спектрометра.

Превращение N-концевого аминокислотного остатка в тиогидантоин приводит к укорочению анализируемой полипептидной цепи на одно звено. Выделив этот пептид, исследователь получает возможность повторить всю процедуру, установить природу второго аминокислотного остатка и выделить полипептид, укороченный на два звена. Многократное повторение такой ступенчатой деградации дает возможность последовательно идентифицировать все составляющие исходный полипептид остатки аминокислот, т.е. установить его первичную структуру. Практически в ручном варианте метод Эдмана позволяет сделать один-два десятка шагов. Работа сводится к многократному повторению одних и тех же чередующихся процедур: добавления изотиоцианата, отщепления тиогидантоина, отделения его от укороченного пептида для последующей идентификации, выделение оставшегося полипептида в виде, пригодном для следующего шага обработки. Чтобы избавить исследователей от такой монотонной работы, требующей вместе с тем строгого соблюдения условий эксперимента на каждом шаге, созданы специальные автоматизированные установки для проведения всех перечисленных операций — *автоматические секвенаторы полипептидов*. С их помощью удается провести до 40 — 60 шагов ступенчатой деградации.

Особенно удобно для автоматизации проведение ступенчатой деградации полипептида, ковалентно привязанного к нерастворимому полимерному носителю. В этом случае на всем протяжении секвенирования исследуемый образец остается

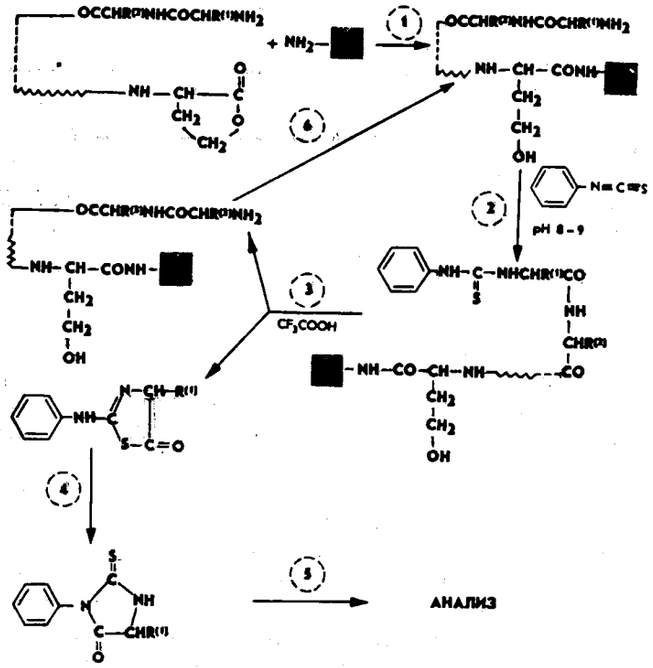


Рис. 75. Схема «твердофазного» секвенирования полипептида на примере фрагмента, полученного расщеплением бромцианом. Зачерненный квадрат – полимерный носитель

Основные стадии: *1* – присоединение полипептида к носителю; *2* – пропускание раствора фенилизотиоцианата для присоединения к непротонированной α-аминогруппе пептида; *3* – промывка бензолом и пропускание раствора CF_3COOH, приводящее к отщеплению фенилтиазолина, содержащего боковой радикал аминокислоты R(1) и укороченный на одну аминокислоту пептид; *4* – промывка и перевод фенилтиазолина в фенилтиогидантоин; *5* – хроматографический или масс-спектрометрический анализ; *6* – возврат укороченного пептида в повторение цикла процедур 2–5

в колонке, содержащей носитель, а через нее поочередно пропускают изотиоцианат и кислоту (например, CF_3COOH). При этом исключаются какие-либо механические потери секвенируемого полипептида, чрезвычайно облегчается процедура отмывки образца от одного из компонентов перед пропусканием второго компонента. На рис. 75 представлена схема присоединения к полимерному носителю фрагментов, полученных расщеплением белка по остаткам метионина бромцианом, и последовательность операций, используемых для автоматического секвенирования. Каждая стадия метода Эдмана по своей идеологии полностью отвечает канонам классической аналитической химии, согласно которым при невозможности идентифицировать и количественно определить вещество его следует количественно превратить в производное, поддающееся непосредственной идентификации. В данном случае на каждой стадии метода речь идет об определении природы N-концевого аминокислотного остатка. В составе полипептидной цепи это сделать не удается и его отщепляют для последующего определения в виде тио-

гидантоина. Попытки разработать аналогичные подходы для анализа полинуклеотидных цепей не увенчались значимыми успехами.

Завершающим этапом установления первичной структуры является восстановление порядка, в котором просеквенированные фрагменты располагались в исходном биополимере. Чаще всего для этой цели используют подход, который в белковой химии известен как *метод перекрывающихся блоков*. Ниже излагается основная идея метода, которая иллюстрируется на примере восстановления полной первичной структуры из фрагментов бычьей панкреатической рибонуклеазы.

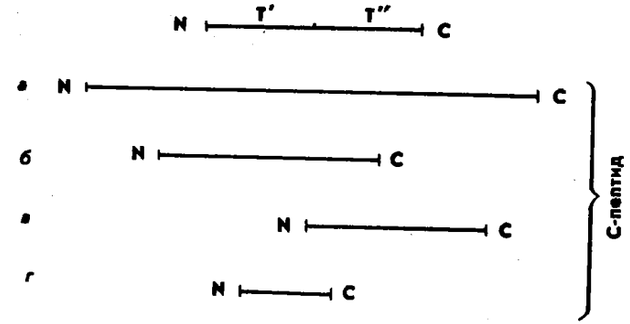


Рис. 76. Возможные варианты перекрывания пептидов. Т-Пептиды получены расщеплением трипсином. С-химотрипсином. С-Пептид содержит:

а - соседние пептиды Т′ и Т″; *б* - пептид Т′ и N-конец пептида Т″; *в* - пептид Т″ и С-конец пептида Т′; *г* - С-конец пептида Т′ и N-конец пептида Т″

Если установлена структура всех полипептидов, полученных расщеплением исследуемого белка с помощью трипсина (далее такие полипептиды обозначаются буквой Т — от слова «трипсиновые», tryptic), то остается определить для каждого из этих пептидов, с какими двумя Т-пептидами он соседствует с N- и С-конца. В структуре просеквенированных Т-пептидов такая информация полностью отсутствует. Однако ее можно частично, а в ряде случаев и полностью восстановить, если располагать аналогичными данными для серии полипептидов, полученных расщеплением того же исследуемого белка по какой-либо другой группе аминокислотных остатков. Для определенности ниже речь будет идти о полипептидах, полученных расщеплением химотрипсином (пептиды группы С, chymotryptic).

Как видно из рис. 76, если два Т-пептида являются соседними в исходной цепи, то существует С-пептид, который либо содержит в своем составе полностью оба или один из рассматриваемых Т-пептидов, либо как минимум содержит С-концевую часть левого и N-концевую часть правого пептида группы Т. Этот С-пептид перекрывает два соседних Т-пептида, с чем и связано название метода.

Таким образом, просматривая структуры пептидов Т и С, можно для любой пары Т-пептидов выявить, являются ли они соседями в исследуемом белке или разделены одним или несколькими другими Т-пептидами. Неоднозначность может появиться только в случае, если перекрываемый каким-либо из С-пептидов концевой фрагмент встречается у двух или нескольких Т-пептидов. Вероятность такого совпадения, как правило, невелика. Если это все же происходит, приходится прибегнуть к еще одному варианту расщепления.

В табл. 7.4 приведены структуры пептидов, полученных расщеплением рибонуклеазы с помощью трипсина и химотрипсина. Естественно, что, когда происходит разделение смеси пептидов трипсинового или химотрипсинового гидролиза-

Таблица 7.4. **Структуры фрагментов, полученных при расщеплении панкреатической рибонуклеазы крупного рогатого скота трипсином (Т-фрагменты) и химотрипсином (С-фрагменты)**

Трипсиновые пептиды		Химотрипсиновые пептиды	
Т-фрагмент	аминокислотная последовательность	С-фрагмент	аминокислотная последовательность
T_1	CK	C_1	QSY
T_2	SR	C_2	DASV
T_3	DR	C_3	PNCAY
T_4	FER	C_4	VPVHF
T_5	NLTK	C_5	KETAAAKF
T_6	NVACK	C_6	STMSITDCRETGSSKY
T_7	ETGSSK	C_7	ERQHMDSSTSAASSSNY
T_8	TTQANK	C_8	KTTQANKHIIVACEGNPY
T_9	YPNCAYK	C_9	CNQMMKSRNLTKDRCKPVNTF
T_{10}	KETAAAK	C_{10}	VHESLADVQAVCSQKNVACKNGQTNCY
T_{11}	NGQTNCYQSYSTMSITDCR		
T_{12}	PVNTFVHESLADVQAVCSQK		
T_{13}	HIIVACEGNPYVPVHFDASV		
T_{14}	QNMDSSTSAASSSNYCNQMMK		

тов, никакой нумерации, связанной с их расположением в полипептидной цепи белка, ввести невозможно. Их нумеруют для удобства промежуточных рассуждений обычно по взаимному расположению в системе, используемой для разделения. В приведенном примере они пронумерованы в порядке увеличения длины, а при одинаковой длине — произвольно.

Очевидно, что N-концевые группы всех Т-пептидов отличаются от N-концевых групп С-пептидов, поскольку использованные для расщепления ферменты действуют по разным точкам. Исключение составляют пептиды, полученные из N-конца исходной цепи, они должны иметь одинаковое начало. Из рассмотрения приведенных в табл. 7.4 структур видно, что таковыми являются пептиды Т-10 и С-5. При этом пептид Т-10 входит в состав С-5, который в дополнение к Т-10 содержит остаток F (фенилаланин). Следовательно, пептид серии Т, примыкающий с С-конца к Т-10, должен начинаться с фенилаланина. Таковым в приведенной серии является только пептид Т-4, т.е. последовательность трипсиновых фрагментов с N-конца молекулы Т-10, Т-4. Этот «двойной» Т-пептид содержит весь пептид С-5 и сверх того фрагмент ER. Следовательно, к С-5 должен примыкать пептид С-7, начинающийся с этих двух аминокислотных остатков. Следующая за аргинином основная часть пептида С-7 является N-концевой частью пептида Т-14, который примыкает в исходной структуре к Т-4. Восстановленная таким путем N-концевая последовательность рибонуклеазы приобретает вид Т-10, Т-4, Т-14. Последний содержит остаток тирозина (Y), т.е. точку расщепления химотрипсином. Поэтому третий слева пептид группы С должен начинаться с последовательности CNQMMK. Это позволяет записать блок С-пептидов на N-конце в виде С-5, С-7, С-9. Пептид С-9 содержит в своем составе сразу несколько Т-пептидов —

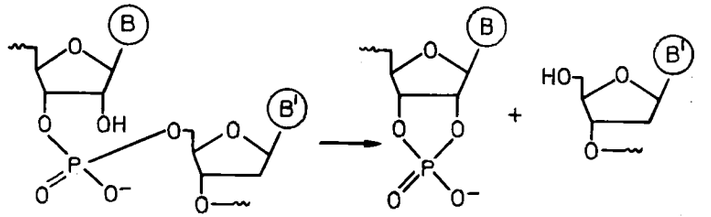
Т-2, Т-5, Т-3, Т-1, поскольку имеет в своем составе три остатка лизина и один остаток аргинина. За последним лизином в составе С-9 содержится фрагмент PVNTF, с которого начинается пептид Т-12, который тем самым следует разместить за пептидом Т-1. Дальнейшая последовательность восстанавливается на основании аналогичных рассуждений, при этом принимаем во внимание, что Т-12 содержит начало С-10; С-10 содержит целиком Т-6 и начало Т-11; Т-11 содержит С-1 и начало С-6; С-6 содержит целиком Т-7 и начало Т-9; Т-9 содержит С-3 и начало С-8; С-8 содержит целиком Т-8 и начало Т-13; Т-13 содержит С-4 и С-2. Таким образом, последовательность Т-пептидов и С-пептидов в исходной цепи имеет вид

$$\text{T10} - \text{T4} - \text{T14} - \text{T2} - \text{T5} - \text{T3} - \text{T1} - \text{T12} - \text{T6} - \text{T11} - \text{T7} - \text{T9} - \text{T8} - \text{T13}$$
$$\text{C5} - \text{C7} - \text{C9} - \text{C10} - \text{C1} - \text{C6} - \text{C3} - \text{C8} - \text{C4} - \text{C2}$$

Приведенный пример является вполне «благополучным» в том смысле, что нигде не возникает неоднозначностей в принятии решения по объединению пептидов. Нетрудно, однако, убедиться, что если бы, например, в серии С-пептидов оказалось два пептида, имеющих на N-конце дипептид ER, то осталось бы неясным, какой из них примыкает к С-концу пептида С-5. Точно так же, что еще более вероятно, если бы в серии Т-пептидов имелось два (или более) пептида, начинающихся с остатка фенилаланина, то осталось бы неясным, какой пептид примыкает к С-концу пептида Т-10. Вероятность таких совпадений повышается с ростом размера белка, чему сопутствует рост числа пептидов, образующихся при трипсиновом, химотрипсиновом или каком-либо другом специфичном расщеплении. Как уже говорилось, в этом случае приходится прибегать к большему числу вариантов специфического расщепления цепи.

7.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Аналогичные трипсину и химотрипсину ферменты, расщепляющие по мономерным остаткам определенного типа, существуют и для рибонуклеиновых кислот. К их числу относится рассмотренная ранее панкреатическая рибонуклеаза, или, как ее сокращенно называют, РНКаза А. Этот фермент специфично расщепляет РНК после остатков пиримидиновых нуклеотидов с образованием на первом этапе на образовавшемся новом 3′-конце отщепленного фрагмента 2′,3′-циклофосфатной группы, а на 5′-конце второго фрагмента — свободной 5′-гидроксигруппы



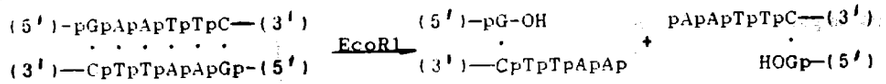
(VII.15)

где B — урацил или цитозин.

Известен и широко используется и более избирательный фермент Т1 РНКаза, которая катализирует аналогичное расщепление после остатков гуанозина. Однако средний размер получаемых в обоих случаях фрагментов очень мал, а число фрагментов, образующихся из больших молекул РНК, весьма велико. Даже если

удается их разделить и определить их первичную структуру, как правило, не удается собрать из этих данных полную исходную структуру РНК даже в случае таких сравнительно небольших молекул, как транспортные РНК. Поэтому, хотя на этом пути с некоторыми дополнительными ухищрениями и были получены первые данные о структуре рибонуклеиновых кислот, прямое секвенирование РНК имеет ограниченное применение.

Совершенно иначе обстоит дело с ДНК. У многих бактерий найдены ферменты, которые гидролизуют двунитевую ДНК по участкам, обладающим строго определенной последовательностью из нескольких нуклеотидов, чаще всего четырех или шести. Такие фрагменты встречаются довольно редко — в среднем соответственно один на 256 для фрагментов из четырех нуклеотидов или один на 4048 для фрагментов из шести нуклеотидов, т.е. фрагменты в среднем имеют значительную длину, а число фрагментов со строго определенной последовательностью не очень велико. Расщепление обеих нитей происходит по участкам, которые для большинства ферментов этой группы построены из двух идентичных фрагментов или, как принято говорить, самокомплементарны. Например, фермент из *E.coli*, называемый сокращенно EcoR1, катализирует гидролиз по участкам, с последовательностью нуклеотидов G — A — A — T — T — C, причем расщепление в обеих цепях происходит между остатками G и A. Схема расщепления, таким образом, может быть записана в виде



Эти ферменты известны под общим названием *эндонуклеазы рестрикции*. Термин *эндонуклеаза* означает, что фермент катализирует расщепление нуклеиновой кислоты по внутренним фосфодиэфирным связям в отличие от *экзонуклеаз*, катализирующих отщепление концевых звеньев нуклеиновой кислоты (к их числу относится упоминавшаяся в § 7.3 фосфодиэстераза из змеиных ядов). Сокращенно эндонуклеазы рестрикции называют *рестриктазами*. В табл. 7.5 перечислены некоторые из наиболее широко используемых при изучении структуры ДНК и других биохимических исследованиях рестриктазы.

С помощью рестриктаз удается расщепить большие молекулы ДНК на фрагменты умеренной длины, которые, как правило, могут быть разделены электрофорезом. Совпадение длин двух фрагментов, которое воспрепятствовало бы разделению, — событие маловероятное. В том случае, если все же это происходит, следует воспользоваться ферментом другой специфичности.

Участки ДНК, по которым происходит расщепление той или иной рестриктазой, называют сайтами рестрикции. Поскольку эндонуклеазы рестрикции используются не только для подготовки ДНК к секвенированию, но и для других целей, в частности для генной инженерии (см. § 7.11), распределение сайтов рестрикции вдоль молекулы ДНК является важной характеристикой ДНК. Установление взаимного расположения этих сайтов называют *физическим картированием* ДНК, а саму схему такого распределения — физической картой ДНК*.

*Термин «физический» здесь используется просто как альтернатива «биологическому», т.е. распределению в молекуле ДНК участков, программирующих различные гены.

Таблица 7.5. **Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности (стрелками показаны точки расщепления)**

Микроорганизм	Сокращение	Последовательность 5′ ⟶ 3′ / 3′ ⟶ 5′
Bacillus amyloliquefaciens H	BamHI	↓ GGATCC / CCTAGG ↑
Escherichia coli RY13	EcoRI	↓ GAATTC / CTTAAG ↑
Haemophilus aegyptius	HaeII	↑↓ PuGCGCPy / PyCGCGPu
Haemophilus aegyptius	HaeIII	↑↓ GGCC / CCGG
Haemophilus haemolyticus	HhaI	↑↓ GCGC / CGCG
Haemophilus influenzae Rd	HindII	↓ GTPyPuAC / CAPuPyTG ↑
Haemophilus influenzae Rd	HindIII	↓ AAGCTT / TTCGAA ↑
Haemophilus parainfluenzae	HpaI	↓ GTTAAG / CAATTG ↑
Haemophilus parainfluenzae	HpaII	↓ CCGG / GGCC ↑
Streptomyces albus G	SaLI	↓ GTCGAC / CAGCTG ↑

Прорыв в секвенировании полинуклеотидов, в первую очередь ДНК, был совершен после того, как исследователи отказались от основных канонов аналитической химии и пошли по принципиально иному пути, позволившему задачу, длительное время казавшуюся невыполнимой, превратить в рутинную процедуру.

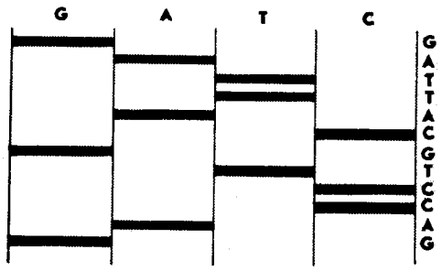


Рис. 77. Идеализированная схема секвенирования ДНК в геле и определенная последовательность

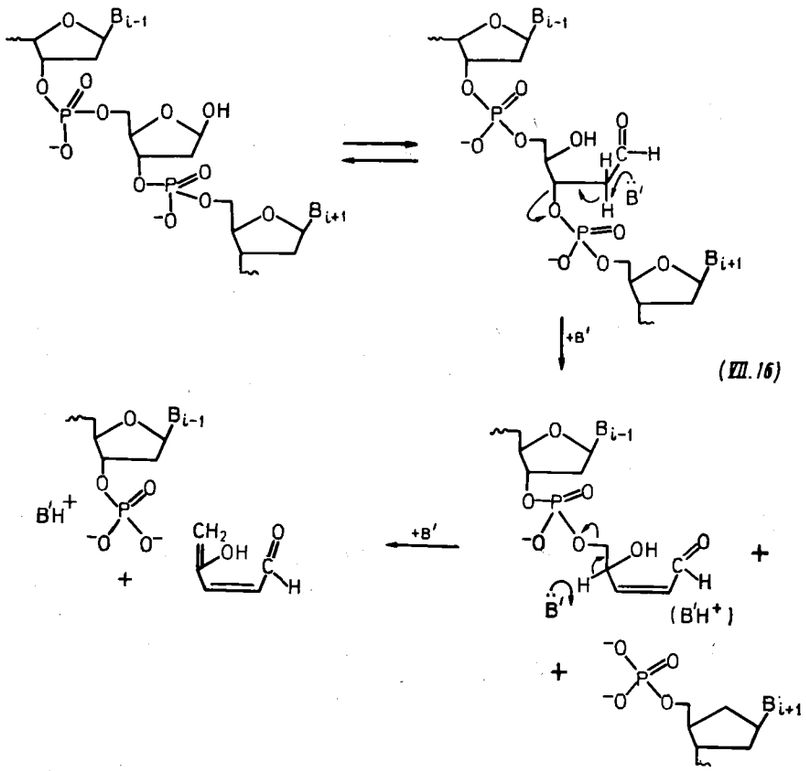
Почти одновременно было предложено два метода, основанных на одной принципиальной идеологии, хотя резко отличающихся по своему химическому содержанию. Эти методы известны как *метод Максама – Гилберта и метод Сэнгера.*

Первый этап метода Максама — Гилберта состоит в том, что в 5′-конец анализируемого полинуклеотида с помощью полинуклеотид киназы вводят меченый остаток фосфорной кислоты максимально доступной удельной активности. В дальнейшем манипулируют со столь малыми количествами образца, что регистрации поддаются только его производные, содержащие 5′-конец, т.е. высокорадиоактивный остаток фосфорной кислоты, а любые иные производные, если даже присутствуют, остаются немечеными и потому нетестированными (невидимыми).

На втором этапе гомогенный, меченный по 5′-концу полинуклеотид подвергается в четырех отдельных пробах химической обработке, приводящей к специфическому или, по крайней мере, преимущественному расщеплению по одному из четырех типов нуклеотидных остатков. Используемые химические реакции приведены ниже. Существенным моментом этого этапа является проведение каждой из четырех реакций на такую глубину, что в среднем на каждую цепочку приходится один разрыв. Это нетрудно осуществить путем подбора времени реакции и концентраций используемых реагентов. В итоге в каждой из четырех проб «видимыми» в только что упомянутом смысле этого слова остаются фрагменты исходного полинуклеотида, содержащие неповрежденный 5′-конец и обрезанные по всем мыслимым точкам, содержащим определенный тип нуклеотида.

На третьем этапе проводится электрофорез всех четырех проб в полиакриламидном геле. Для того чтобы условия разделения были идентичными во всех четырех пробах, пробы наносят на один гель и разделяют на четырех параллельных дорожках этого геля. Разделение, как уже говорилось в § 7.1, проходит по длине, и положение каждого фрагмента, детектируемое радиоавтографически, дает его длину, а тем самым и положение соответствующего мономера в исходной цепи. Таким образом, на одной дорожке, если речь идет о ДНК-фрагменте, определяется положение всех остатков тимидина, на другой — всех остатков дезоксицитидина, на третьей — всех остатков дезоксигуанозина и на четвертой — всех остатков дезоксиаденозина. В сумме это дает положение в исходном полинуклеотиде всех мономеров, а это и означает, что определяется его первичная структура. Эта структура в один прием считывается с геля, причем при достаточной длине дорожки геля одновременно может быть определено расположение сотен мономерных звеньев. Идеализированная схема такого разделения и определяемая последовательность приведены на рис. 77.

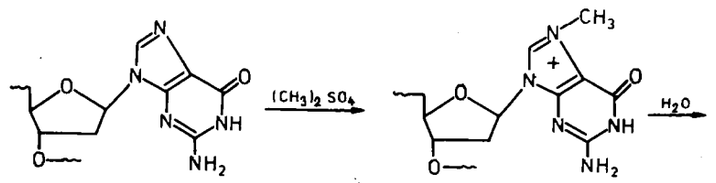
Метод расщепления, используемый при секвенировании по Максаму — Гилберту, основан на реакции расщепления полидезоксирибонуклеотидной цепи по остаткам, лишенным гетероцикла, т.е. по апуриновым или апиримидиновым фрагментам. Это расщепление проходит в присутствии оснований по схеме

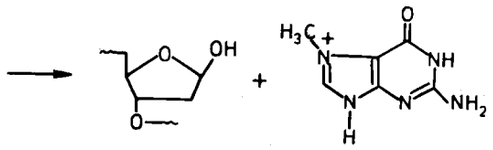


(здесь B′ — катализирующее основание).

Оба разрыва являются процессами β-элиминации, т.е. элиминации радикала, находящегося в β-положении к полярной двойной связи C=O или к системе сопряженных связей C=C—C=O. Процесс в равной степени может проходить, если вместо альдегидной группы находится гидразонная —CH=N—NH$_2$.

Практически для получения апуриновых и апиримидиновых сайтов в ДНК используют три типа превращений — метилирование диметилсульфатом, обработку муравьиной кислотой и реакцию с гидразингидратом. Реакция с диметилсульфатом при pH 3,5 приводит к алкилированию атома N7 остатков гуанина, которые, приобретая положительный заряд, облегчают атаку водой гликозидного атома C1′:

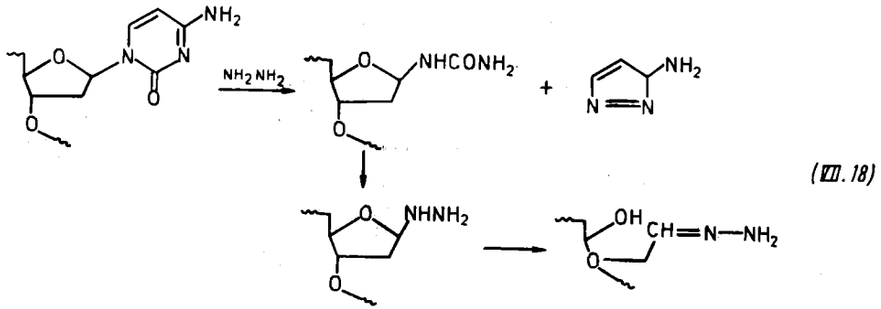




(VII.17)

В 66%-ной муравьиной кислоте протонируются как остатки гуанина, так и остатки аденина, в результате чего происходит апуринизация по обоим типам гетероциклов. При последующей обработке пиперидином происходит расщепление цепи в первом случае только по остаткам дезоксигуанозина, во втором — по обоим пуриновым нуклеотидам. В итоге при радиоавтографии геля на первой дорожке выявляются все остатки, соответствующие гуанинам, на второй — и гуанинам и аденинам. Очевидно, что этой информации достаточно, чтобы раздельно определить положения в цепи обоих пуриновых нуклеотидов.

Обработка гидразингидратом приводит к расщеплению пиримидинового кольца с последующим замещением остатка мочевины на остаток гидразина и изомеризацией его в гидразон:



(VII.18)

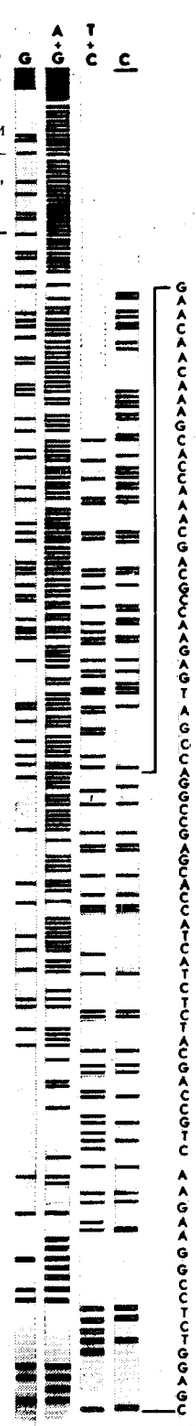
Реакция проходит как по остаткам цитозина, так и по остаткам тимина. Однако в щелочной среде (0,1М **КОН** в гидразингидрате) реакция по дезокситимидиновым фрагментам подавляется и модификация проходит только по остаткам дезоксицитидина. Это позволяет получить картину распределения остатков обоих пиримидиновых нуклеотидов и отдельно — дезоксицитидиновых звеньев. Этой информации достаточно, чтобы определить положение раздельно по каждому из пиримидиновых нуклеотидов. На рис. 78 приведены радиоавтограф геля, полученного методом Максама — Гилберта, и прочитываемая по этому гелю последовательность секвенированного полинуклеотида.

Изложенный метод с точки зрения канонов классической аналитической химии противоестествен. Для установления структуры гомогенного полинуклеотида его превращают в чрезвычайно сложную смесь фрагментов. Но именно это дает возможность после проведения электрофореза с одного геля сразу прочесть структуру, состоящую из многих десятков, а в некоторых случаях даже из нескольких сотен звеньев. Это связано со спецификой объекта — биополимера, построенного из большого числа заранее изученных и не слишком разнообразных структурных элементов.

В принципе тот же подход может быть использован для установления структуры РНК с той существенной разницей, что описанные для ДНК химические

Рис. 78. Радиоавтограф геля, полученного методом Максама–Гилберта, и прочитываемая по этому гелю последовательность секвенированного участка кДНК-фрагмента генома вируса клещевого энцефалита (по данным А.Г. Плетнева)

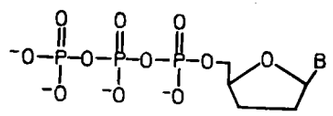
Электрофорез проводился в 4%-ном полиакриламидном геле в присутствии 8 моль/л раствора мочевины. Над дорожками, в которых проводилось разделение ^{32}P-меченного фрагмента после селективного расщепления по гетероциклам, указано, по каким нуклеотидам проводилось расщепление



методы для расщепления по звеньям определенного типа в случае РНК неприменимы. Однако для РНК известны ферменты, расщепляющие полирибонуклеотидную цепь по определенным типам нуклеотидов, так что общая методология может быть использована и в этом случае.

Практически параллельно с методом Максама — Гилберта был развит другой метод секвенирования ДНК, получивший по имени создавшего его автора название метод Сэнгера. Этот метод считается наиболее перспективным для исследования первичной структуры больших молекул нуклеиновых кислот, вплоть до ДНК хромосом человека. В его основе лежит анализ структуры не самой нуклеиновой кислоты, а продукта, получаемого в ходе ее репликации с помощью ДНК-полимеразы. Аналогично, используя обратную транскрипцию, с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы можно анализировать структуру молекул РНК.

В своем оригинальном варианте метод заключается в использовании исследуемой ДНК в качестве матрицы для ДНК-полимеразы I из *E.coli*, или, точнее, так называемого фрагмента Кленова, который получают из ДНК-полимеразы I после протеолитического отщепления домена, ответственного за 5′ — 3′-экзонуклеазную активность. При этом в реакционную смесь вместе с четырьмя дезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатами (дНТФ) добавляют один из *2′,3′-дидезоксирибонуклеозид-5′-трифосфатов* (ддНТФ):



101

B = Thy – ддТТФ

B = Cyt – ддЦТФ

B = Ade – ддАТФ

B = Gua – ддГТФ

Необходимо также добавление праймера (см. § 5.1), комплементарного некоторому участку исследуемой матрицы. Структура участка должна быть заранее установлена, этого можно достигнуть, например, анализом последовательности нуклеотидов небольшого фрагмента исследуемой ДНК методом Максама — Гилберта.

В такой системе начинается удлинение праймера, т.е. синтез

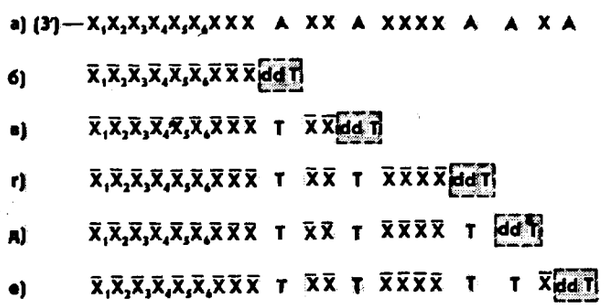


Рис. 79. Схема установления последовательности ДНК по Сэнгеру (*а*):

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$–праймер; $X \cdot \bar{X}$ – комплементарная пара нуклеотидов ($X \neq A$); б - *е* – набор синтезированных олигонуклеотидов с ddT (дидезокситимидинмонофосфатом) на 3′-конце

ДНК, комплементарной анализируемой матрице. Дидезоксинуклезид-5′-трифосфаты являются близкими структурными аналогами природных субстратов ДНК-полимеразы и, несмотря на отсутствие 3′-гидроксигруппы, опознаются ферментом и матрицей и включаются в строящуюся полинуклеотидную цепь. Если такое включение произошло, то дальнейший рост цепи прекращается, так как присоединившийся дидезоксинуклеотидный фрагмент лишен 3′-гидроксигруппы, необходимой для присоединения следующего звена цепи. Таким образом, ддНТФ играют роль терминаторов репликации. Так как наряду с введенным в реакционную смесь ддНТФ в ней присутствует аналогичный природный субстрат, то терминация на каждом данном участке происходит в небольшом числе случаев и статистически, т.е. возникает набор олигомеров или полимеров разной длины. При этом если, например, в реакционную смесь был введен ддТТФ, то получаемый набор продуктов представлен фрагментами, имеющими на 3′-конце остаток ддТТФ, длины которых соответствуют порядковым номерам остатков дТМФ в синтезируемых продуктах, если вести отсчет от 5′-конца праймера (рис. 79). Эти порядковые номера находят, как и в методе Максама — Гилберта, после разделения полученной смеси фрагментов электрофорезом в полиакриламидном геле по положению соответствующих им полос на снятой с геля фотокопии. Полученные номера одновременно являются номерами остатков дАМФ исследуемой матрицы, отсчитываемыми от ее звена, взаимодействующего с 5′-концом праймера.

Аналогично, приготовляя такие же реакционные смеси, в которые вместо ддТТФ введены ддЦТФ, ддАТФ или ддГТФ, можно определить положение на матрице остатков дГМФ, дТМФ и дЦМФ, а следовательно, и полную последовательность нуклеотидов реплицированного участка матрицы. Таким способом может быть прочитана последовательность в несколько сотен нуклеотидов. После этого можно синтезировать олигонуклеотид, комплементарный 5′-концу секвенированной последовательности, и использовать его в качестве праймера для проведения следующего цикла секвенирования.

В исходном варианте для изложенного метода определения последовательности нуклеотидов использовали дезоксинуклеозид-5′-трифосфат, меченный радиоактивными изотопами ^{32}P или ^{33}P в α-положении трифосфатной группы. Радиоактивная метка попадала в каждое звено синтезируемой цепи, что обеспечивало высокую чувствительность метода.

В настоящее время наметилась тенденция к переходу на менее чувствительный, но зато легко поддающийся автоматизации флуоресцентный метод. С этой целью либо к праймеру, либо к терминирующим ддНТФ присоединяют специальные красители, дающие при облучении лучом лазера интенсивную флуоресценцию. В специальных приборах для *автоматического секвенирования* по ходу электрофореза в некоторой области геля проводится непрерывная регистрация интенсивности флуоресценции и ее спектральных характеристик. Таким образом, ход разделения фиксируется сразу во время электрофореза. При этом для анализа распределения вдоль синтезируемой цепи ДНК каждого из четырех нуклеотидов используют четыре разных красителя, отличающихся спектрами флуоресценции. Анализируя спектры каждой полосы, проходящей через регистрирующее устройство, можно сразу определить, какому красителю, а следовательно, какому нуклеотиду эта полоса соответствует, т.е. проводить определение последовательности на одной дорожке вместо четырех. В сочетании с достаточно мощными ЭВМ, обеспечивающими быструю обработку спектральных данных, поступающих с большого числа дорожек геля, можно одновременно анализировать много образцов. Этот подход положен в основу создания техники, позволяющей на одном приборе определять последовательности нескольких сотен тысяч нуклеотидов в течение суток. Такие темпы стали весьма актуальны в связи с уже ведущимися работами по установлению полной первичной структуры ДНК всех хромосом человека (структуры генома человека), которые содержат несколько миллиардов пар нуклеотидов.

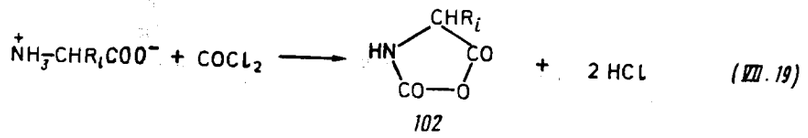
7.9. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Химический синтез полипептидов и белков имеет большое теоретическое и практическое применение. Пептидные модели широко используются для изучения белок-белковых и белково-нуклеиновых взаимодействий. Некоторые гормоны являются пептидами и необходимы в больших количествах для медицинских целей. Некоторые из них, а именно инсулин и вазопрессин, были описаны в § 2.1. Огромный интерес к синтетическим пептидам возник, когда открыли большую группу пептидов мозга. Первыми были открыты метионин-энкефалин Tyr—Gly—Gly—Phe—Met и лейцин-энкефалин Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu. Эти два пептида связываются с теми же мозговыми рецепторами, что и опиаты, например морфин. Таким образом, их можно использовать вместо морфина в качестве анальгетика. Основное достоинство этих пептидов заключается в том, что опасность привыкания к ним существенно ниже, чем к морфину.

Традиционная синтетическая макромолекулярная химия обычно имеет дело с получением гомополимеров, построенных из однотипных мономерных единиц по всей цепи. Разработаны методы, позволяющие получать тысячи и миллионы тонн многих полимеров. Те же технологии позволяют в случае необходимости получать сополимеры, состоящие из двух (или более) сходных типов мономеров со статистическим распределением их по цепи. В частности, возможно получение гомополимеров или статистических сополимеров, состоящих из аминокислотных остатков, связанных между собой пептидными связями (полиаминокислот). Общей проблемой как при получении полиаминокислот, так и в синтезе нерегулярных полипептидов является образование пептидной связи. Если речь идет об образовании пептидной связи из аминокислот, то предварительно их надо прев-

ратить в активные производные. Это необходимо по крайней мере по двум причинам. Во-первых, образование пептидной связи в водном растворе неблагоприятно с точки зрения термодинамики, так как ее $\Delta G_0 > 0$. Соответственно этот процесс необходимо совместить с экзэргоническим процессом с $\Delta G_0 < 0$, с тем чтобы суммарное значение ΔG было близко к нулю, а еще лучше — превосходило по абсолютной величине значение ΔG образования пептидной связи. Во-вторых, и карбоксильная и аминогруппа являются нуклеофилами, так что прямое взаимодействие между ними неблагоприятно с кинетической точки зрения. Обе проблемы обычно решаются одновременно, так как превращение одной из функциональных групп аминокислот, чаще всего карбоксильной группы, в электрофильное производное не только снимает кинетические затруднения, но проходит сопряженно с процессом, характеризующимся отрицательным значением ΔG, сообщая аминокислоте необходимое для образования пептидной связи количество свободной энергии.

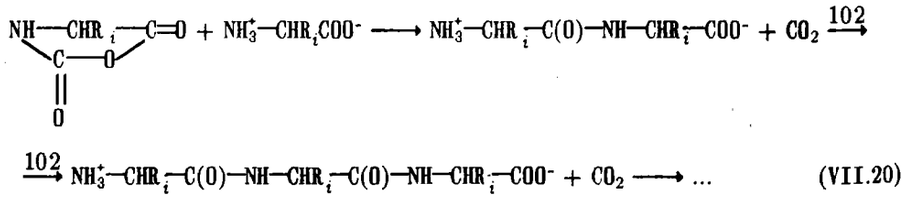
В качестве примера можно привести процесс получения полиаминокислот, основанный на конденсации *N-карбоксиангидридов аминокислот* (102), образуемых из соответствующих аминокислот обработкой фосгеном:



102

(VII.19)

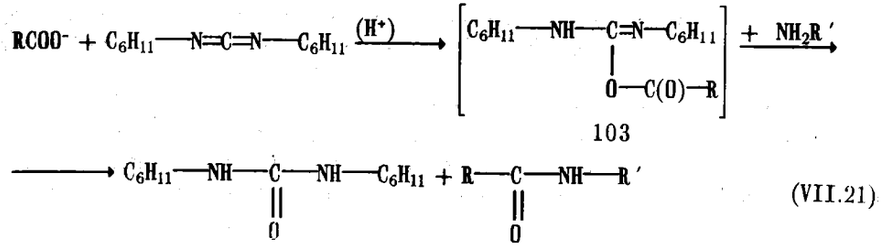
Эти соединения содержат электрофильную ангидридную группу, которая может атаковать алифатическую аминогруппу аминокислоты, используемой в качестве затравки, с выделением CO_2 и одновременным освобождением новой аминогруппы из атакующей молекулы N-карбоксиангидрида. Это создает условие для проведения реакции со следующей молекулой N-карбоксиангидрида, таким образом открывая возможность продолжения поликонденсации:



(VII.20)

Нетрудно заметить, что с учетом реакции (VII.19) каждая стадия поликонденсации сопровождается превращением молекулы $COCl_2$ в CO_2 и 2HCl, что термодинамически выгодно и является источником свободной энергии для образования пептидной связи.

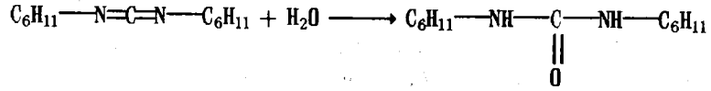
При синтезе нерегулярных полипептидов используются другие методы активации карбоксильных групп. Большинство из них базируется на использовании N,N-дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). Этот реагент, будучи добавленным в смесь карбоновой кислоты $RCOO^-$ и амина NH_2R', способен осуществлять активацию карбоксильных групп *in situ* по реакции



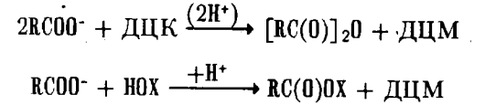
103

(VII.21)

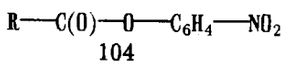
Процесс протекает через высокореакционноспособное промежуточное соединение (103), представляющее собой O-ацил-N,N′-дициклогексилизомочевину. Термодинамически движущей силой процесса является экзэргоническая гидратация ДЦК до дициклогексилмочевины (ДЦМ):



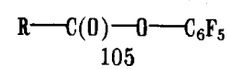
Обычно тем не менее в пептидном синтезе ДЦК используется не непосредственно, а для получения достаточно стабильных реакционноспособных производных аминокислот, ангидридов или активированных эфиров путем реакции с соответствующими гидроксисоединениями:



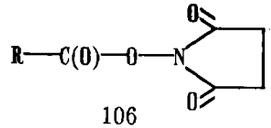
Будучи достаточно активными нуклеофилами, активированные эфиры (103) – (107) должны содержать сильный электронный акцептор X. В ряду разнообразных активированных эфиров необходимо отметить такие, как производные *n*-нитрофенола (104), пентафторфенола (105), N-гидроксисукцинимида (106), N-гидроксибензотриазола (107):



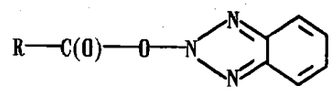
104



105

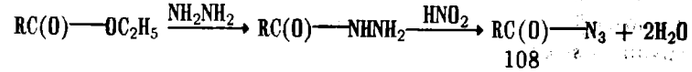


106



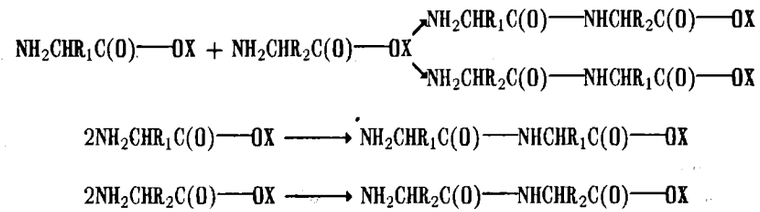
107

В пептидном синтезе также широко используются азиды аминокислот (108). Их легко получают последовательной обработкой эфиров аминокислот гидразином и азотистой кислотой:



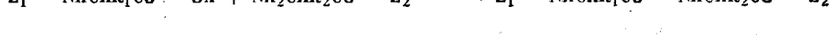
108

Тем не менее ни одно из этих производных нельзя непосредственно использовать для синтеза пептидов определенной структуры. В самом деле, смешивая две аминокислоты с активированными карбоксильными группами, можно получить уже на первой стадии процесса образования четыре разных дипептида:

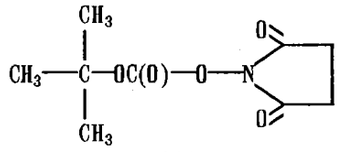


Более того, каждый из этих дипептидов остается реакционноспособным, сохраняя одну из нуклеофильных аминогрупп и одну активированную карбоксильную группу C(O)—OX. Поэтому процесс не останавливается на стадии образования дипептида, а продолжается дальше. Следовательно, в такой смеси можно получить только статистический сополимер.

Для того чтобы обеспечить возможность образования только одного дипептида, необходимо предотвратить образование трех остальных. Очевидно, для того чтобы получить дипептид $NH_2CHR_1C(O)—NHCHR_2COO^-$, необходимо исключить участие в процессе аминогруппы первой аминокислоты и активированной карбоксильной группы второй. В пептидной химии это достигается использованием *защитных групп Z* на тех функциональных группах, которые не должны вступать в реакцию. Реакция



должна приводить к одному определенному дипептиду. Этот дипептид нереакционноспособен и для продолжения процесса необходимо удалить одну из групп Z_1, Z_2, для того чтобы открыть либо NH_2–, либо COOH-группу для следующей стадии удлинения пептидной цепи. Главным требованием к защитным группам Z_1 и Z_2 является возможность их селективного удаления при достаточно мягких или специфических условиях, при которых не затрагиваются другие защитные группы и образованная пептидная связь. Наиболее широко для защиты α-аминогрупп используется *трет*-бутилоксикарбонильная группа (Boc), которую легко ввести в аминогруппу обработкой аминокислоты соответствующим N-гидроксисукцинимидным эфиром:



Эту группу можно удалить слабой кислотной обработкой пептида, при которой пептидная связь не разрушается:

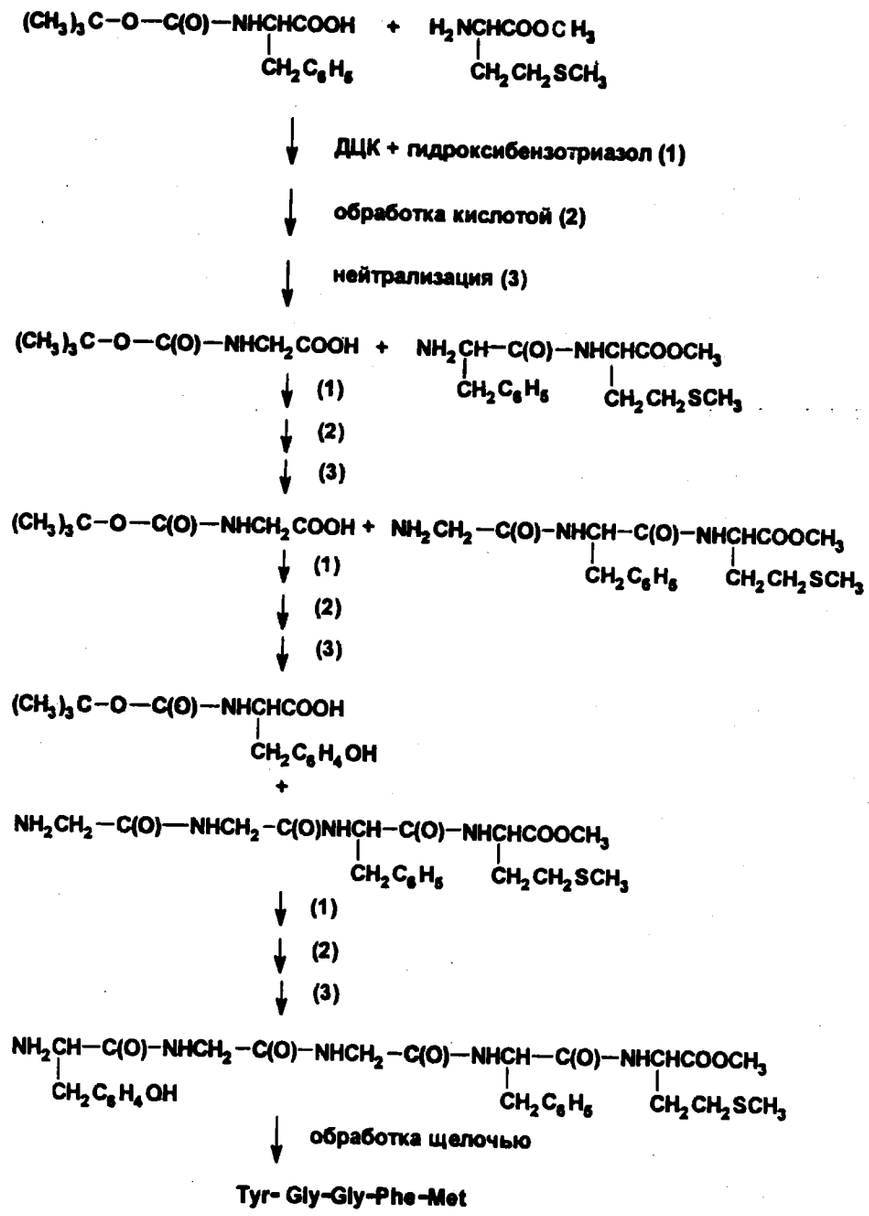
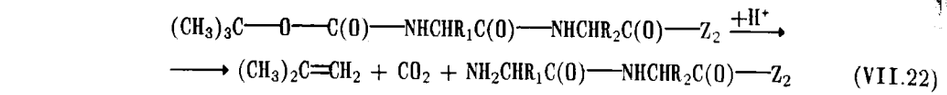


Рис. 80. Схема синтеза пентапептида метионин-энкефалина

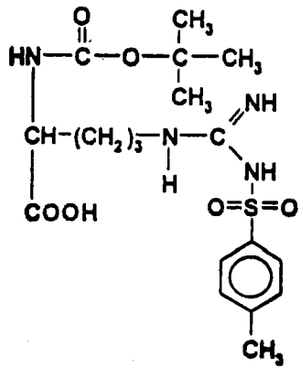
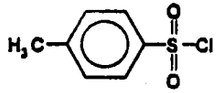


(VII.22)

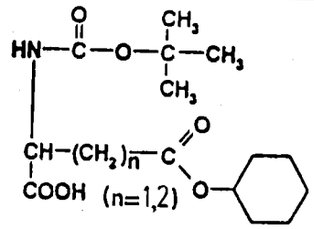
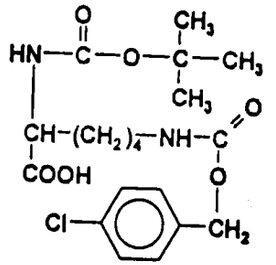
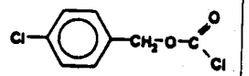
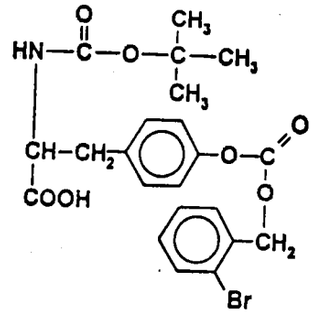
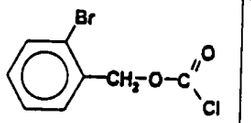
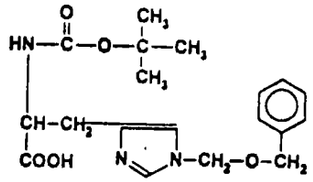
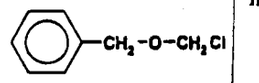
В качестве группы Z_2 используют эфирные группы, которые стабильны в кислой среде в условиях проведения синтеза и могут быть селективно удалены мягкой щелочной обработкой. На рис. 80 приведена в качестве примера схема синтеза пентапептида метионин-энкефалина.

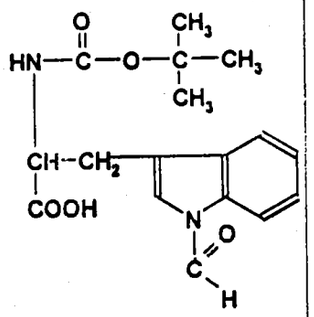
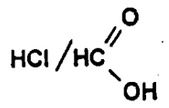
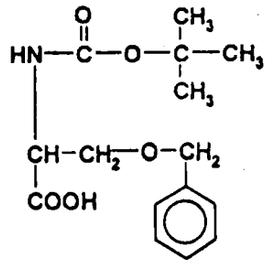
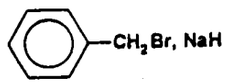
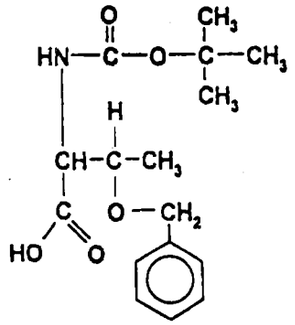
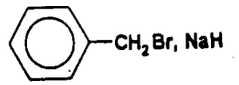
Реакции, используемые для образования пептидной связи и удаления защитных групп, могут повреждать ряд боковых функциональных групп. Поэтому использование защитных групп важно не только для α-амино- и α-карбоксильных групп, но и для многих боковых радикалов. Эти группы должны оставаться защищенными во время всего процесса образования полипептидной цепи и должны удаляться только по завершении процесса. В практике полипептидного синтеза используются различные комбинации этих групп. Они вводятся в мономеры в дополнение к группам, защищающим α-NH_2- и α-COO^--группы. Мономеры, содержащие набор защитных групп и в ряде случаев активированные остатки, делающие возможным их непосредственное использование в процессе синтеза, обычно называют *синтонами*. В качестве примера, в табл. 7.6 приведены синтоны, использованные для синтеза 99-членного пептида, который представляет собой протеазу, кодированную вирусом ВИЧ-1, вызывающим СПИД. Эта протеаза важна для протеолитического разрезания больших полипептидов, образовавшихся при трансляции вирусных мРНК. Огромный интерес к этой протеазе обусловлен надеждой найти специфические ингибиторы протеазы, которые позволят предотвратить созревание вирусных белков и, следовательно, размножение этого вируса.

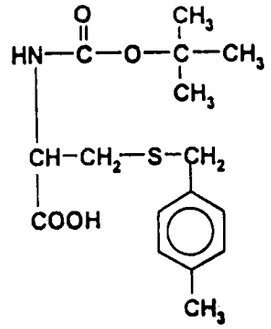
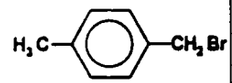
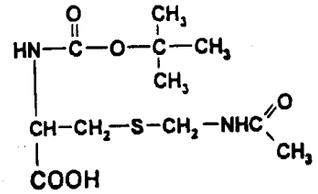
Таблица 7.6. **Синтоны, использованные для синтеза протеазы ВИЧ-1**

Аминокислота	Защитная группа	Синтон	Реагент для защиты боковых радикалов аминокислот	Реагент для снятия защиты
Аргинин	Тозил			HF

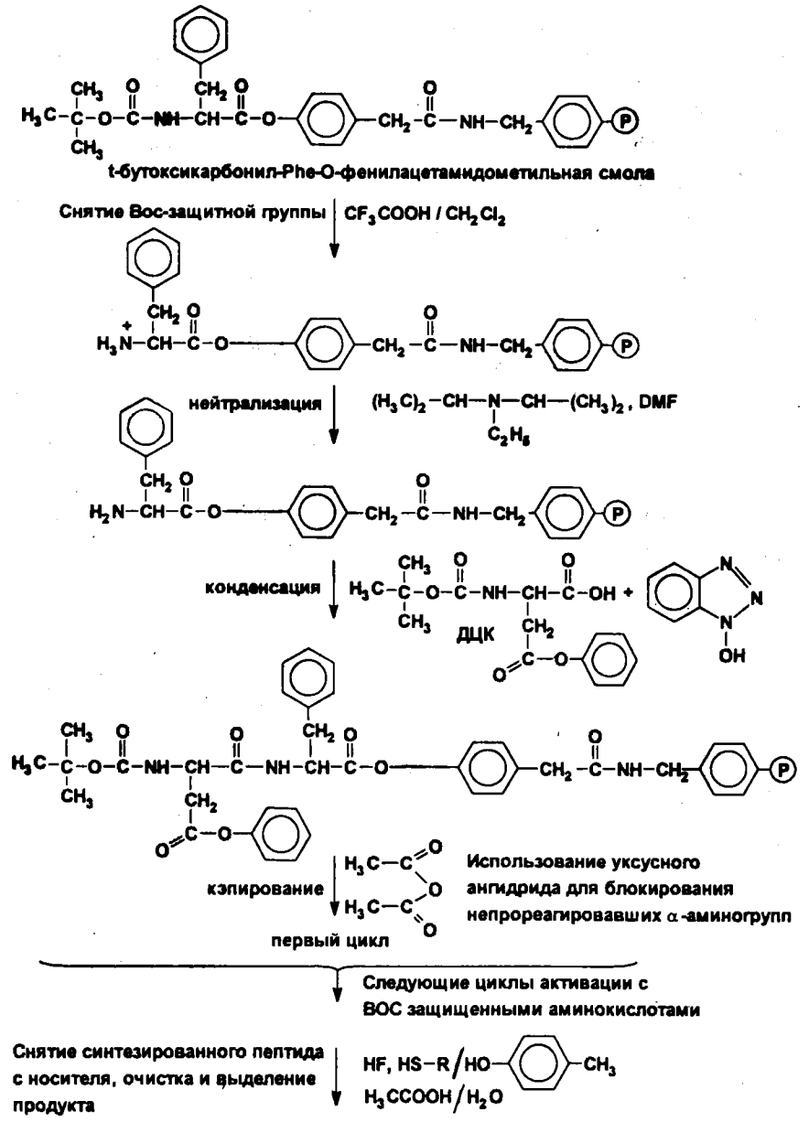
Продолжение табл. 7.6

Аминокислота	Защитная группа	Синтон	Реагент для защиты боковых радикалов аминокислот	Реагент для снятия защиты
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты	Циклогексилокси			HF
Лизин	4-Хлорокарбобензокси			HF
Тирозин	2-Бромокарбобензокси			HF
Гистидин	Бензилоксиметил			HF

Аминокислота	Защитная группа	Синтон	Реагент для защиты боковых радикалов аминокислот	Реагент для снятия защиты
Триптофан	Формил			HF, HS-R*
Серин	Бензил			HF
Треонин	Бензил			HF

Аминокислота	Защитная группа	Синтон	Реагент для защиты боковых радикалов аминокислот	Реагент для снятия защиты
Цистеин	4-Метилбензил			HF
	Ацетамидометил			I_2

Специфической особенностью полипептидного синтеза является огромное число идентичных стадий, которые необходимо проводить на каждом этапе удлинения цепи: образование новой пептидной связи, удаление защитной группы для подготовки к следующей стадии элонгации цепи и промежуточные отмывки от избытка реагентов и побочных продуктов после каждого химического превращения. Метод, предложенный Робертом Меррифилдом, дал возможность автоматизировать этот процесс и снизить механические потери. Согласно этому методу, первый мономер во вновь строящейся цепи синтезируемого полипептида ковалентно связывается с нерастворимым носителем (смолой) и все последующие стадии проводятся с полипептидом, растущим на этой смоле. Этот метод известен как *твердофазный синтез полипептидов*. К смоле попеременно добавляют очередной синтон и реагент для удаления концевой защитной группы. остаток). Химические стадии перемежаются соответствующими промывками. В течение всего процесса полипептид остается связанным со смолой. Поместив в колонку смолу, с которой связан синтезируемый полипептид, можно легко автоматизировать процесс, запрограммировав смену потоков через колонку: синтон (мономер) — растворитель — смесь для удаления защиты — растворитель и т.д. Разработаны специальные приборы для автоматизированного полипептидного синтеза. Так, уже упоминавшийся синтез протеазы ВИЧ-1 провели на автоматическом пептидном синтезаторе «Applied Biosystem» и потребовалось около двух-

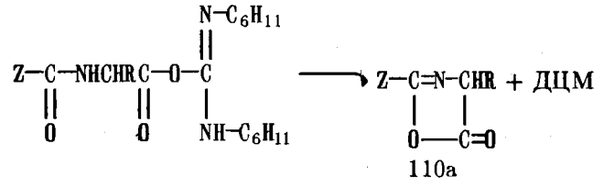


Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Trp-Gln-Arg-Pro-Leu-Val-Thr-Ile-Lys-Ile[15]
Gly-Gly-Gln-Leu-Lys-Glu-Ala-Leu-Leu-Asp-Thr-Gly-Ala-Asp-Asp[30]
Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Met-Ser-Leu-Pro-Gly-Arg-Trp-Lys-Pro-Lys[45]
Gly-Gly-Ile-Gly-Gly-Phe-Ile-Lys-Val-Arg-Gln-Tyr-Asp[60]
Gln-Ile-Leu-Ile-Glu-Ile-Cys-Gly-His-Lys-Ala-Ile-Gly-Thr-Val[75]
Leu-Val-Gly-Pro-Thr-Pro-Val-Asn-Ile-Ile-Gly-Arg-Asn-Leu-Leu[90]
Thr-Gln-Ile-Gly-Cys-Thr-Leu-Asn-Phe[99]

Рис. 81. Схема твердофазного метода синтеза по Меррифилду 99-членного пептида, представляющего собой протеазу, кодированную вирусом ВИЧ-1, вызывающим СПИД

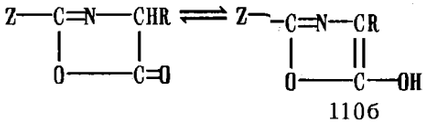
сот химических процедур, не считая промывок, предшествующих каждой смене реагента. На завершающей стадии защищенный пептид, ковалентно связанный со смолой, снимается с нее и защитные группы удаляются соответствующими обработками (рис. 81).

Одной из тяжелых проблем, возникающих при полипептидном синтезе, является рацемизация аминокислот во время синтеза. Активация аминокислот вызывает частичное превращение их в так называемые азлактоны (110а), например по реакции с ДЦК из интермедиата (102):



110а

Азлактон является активированной формой соответствующей ациламинокислоты и может также участвовать в полипептидном синтезе. Однако он может частично таутомеризоваться в (110б):



110б

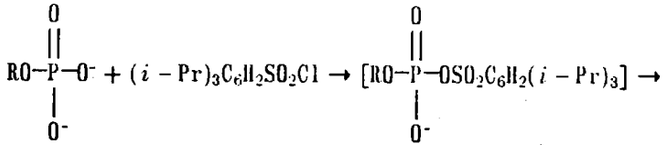
Обратное превращение таутомера (110б) в азлактон происходит нестереоселективно и приводит к рацемизации аминокислотного остатка. Это особенно опасно при твердофазном синтезе, так как в этом случае не используются промежуточные стадии очистки и происходит постоянное накопление диастереомеров в растущей полипептидной цепи. Не существует способов, позволяющих целиком избежать рацемизации. Однако ряд активирующих процедур позволяет снизить степень рацемизации. Наилучшие результаты достигаются использованием ДЦК в смеси с нуклеофильным катализатором, например гидроксибензотриазолом. В этом случае N-ацетиламинокислота (чаще всего Boc-аминокислота) превращается *in situ* в активированный эфир, который существенно меньше склонен к образованию азлактона.

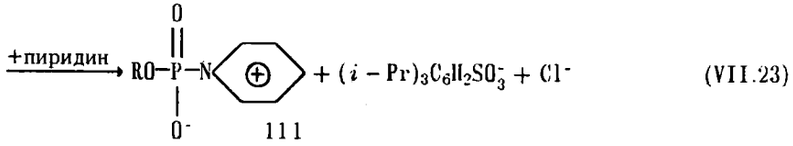
7.10. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Термодинамические и кинетические проблемы, возникающие при химическом синтезе нуклеиновых кислот, не отличаются от уже рассмотренных при пептидном синтезе. Соединение остатка фосфорной кислоты с ОН-группой соседнего нуклеотида неблагоприятно ни термодинамически (процесс сопровождается увеличением свободной энергии системы), ни кинетически, поскольку необходимо взаимодействие двух нуклеофильных остатков. На первом этапе становления химического синтеза олиго-, а затем и полинуклеотидов развитие пошло по тому же пути, который был использован и в пептидном синтезе, а именно по пути

превращения фосфатных остатков в электрофильные производные с одновременным обеспечением их избыточной свободной энергией за счет сопряженного экзэргонического процесса. Так же как и при пептидном синтезе, для получения упорядоченных олигомеров необходимо использовать защитные группы, чтобы на каждом акте конденсации соединять между собой строго определенные фосфорильную и ОН-группу, не давая развиться неупорядоченному процессу статистической поликонденсации. Наличие у трех нуклеотидов экзоциклических аминогрупп потребовало введения защит по этим группам, достаточно устойчивых, чтобы сохранять их на протяжении всего синтеза, и в то же время удаляемых по завершении синтеза без повреждения образовавшихся межнуклеотидных связей.

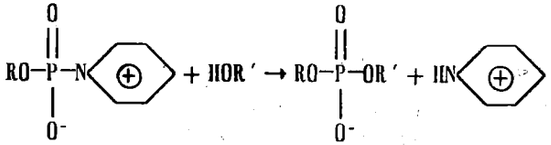
Первый синтез функционального гена был осуществлен Гобиндом Корана с сотр. Синтез состоял из трех основных стадий: получения защищенных мономеров, конденсации их в олигонуклеотиды достаточной длины и объединения их в двуцепочечную ДНК с использованием ДНК-лигазы, описанной в § 5.4. Поскольку метод включает ферментативную стадию, его называют *химико-ферментативным синтезом*. Первый подход к образованию межнуклеотидных связей основывался непосредственно на образовании фосфодиэфирной связи и получил название *фосфодиэфирного метода синтеза*. Фосфатный остаток одного компонента (Р-компонент) активировали путем превращения в электрофильное фосфорилирующее производное и использовали его для этерификации ОН-группы второго компонента (ОН-компонент). Наилучшие результаты были достигнуты при применении триизопропилбензосульфонил хлорида, который, как было показано, в растворе пиридина дает высокореакционноспособное фосфорилпиридиниевое производное Р-компонента (111):





(VII.23)

Это производное легко реагирует с гидроксигруппой ОН-компонента:

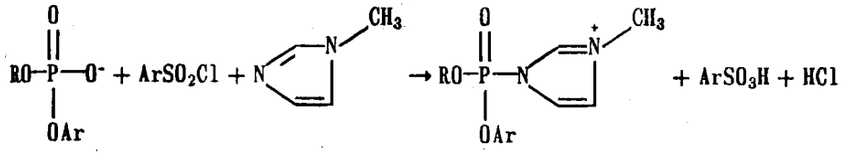


(VII.24)

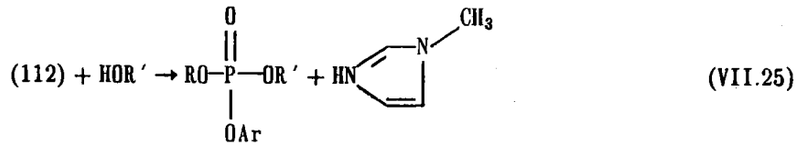
где R, R — нуклеозидные или нуклеотидные фрагменты. Для того чтобы защитить аминогруппу аденина, цитозина и гуанина, соответствующие нуклеозиды или нуклеотиды предварительно превращали в N-бензоил, N-анизоил или N-бутирильное производное. Эти защитные группировки до сих пор остаются наиболее популярными в современных методах конденсации. Тем не менее прямое образование фосфодиэфирных связей оказалось малоэффективным из-за ряда

побочных реакций, приводящих к ощутимому снижению скорости реакции и выходам, далеким от количественных.

Фосфоэфирная конденсация была существенно улучшена путем введения синтонов, которые в совокупности с достаточно стабильными защитными группировками фосфатной группы (главным образом 4-хлорфенил) приводили к образованию межнуклеотидных фосфатных фрагментов, защищенных арильным остатком. Этот метод до сих пор используется и называется *фосфотриэфирным методом олигонуклеотидного синтеза*. Хорошие скорости конденсации были достигнуты при использовании в качестве конденсирующего реагента $(i\text{-Pr})_3\,C_6H_2SO_2Cl$ в присутствии нуклеофильного катализатора, например N-метилимидазолида. Основные стадии фосфотриэфирной конденсации могут быть представлены в следующем виде:

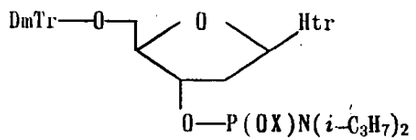


112



(VII.25)

Однако в настоящее время синтез олигонуклеотидов в основном перешел на методы, основанные на фосфитной химии. Наиболее популярным из них является использование в качестве синтонов фосфитамидов (фосфорамидитов) (*фосфитамидный метод синтеза*). Синтоны, используемые в этом методе, имеют строение



где DMTr — 5′-*бис*-(*n*-диметоксифенил)фенилметил (диметокситритил), Htr — N(6)-бензоиладенин, N(4)-бензоилцитозин или N(2)-*i*-бутирилгуанин;

$$X = CH_3 \quad \text{или} \quad CH_2CH_2C{\equiv}N$$

Образование связи между Р- и ОН-компонентами в фосфитамидном методе происходит за несколько минут по сравнению с несколькими часами при фосфотриэфирной или несколькими днями при фосфодиэфирной конденсации. Фосфиттриэфирный фрагмент далее окисляется раствором I_2. Таким образом, основные стадии конденсации можно представить в следующем виде:

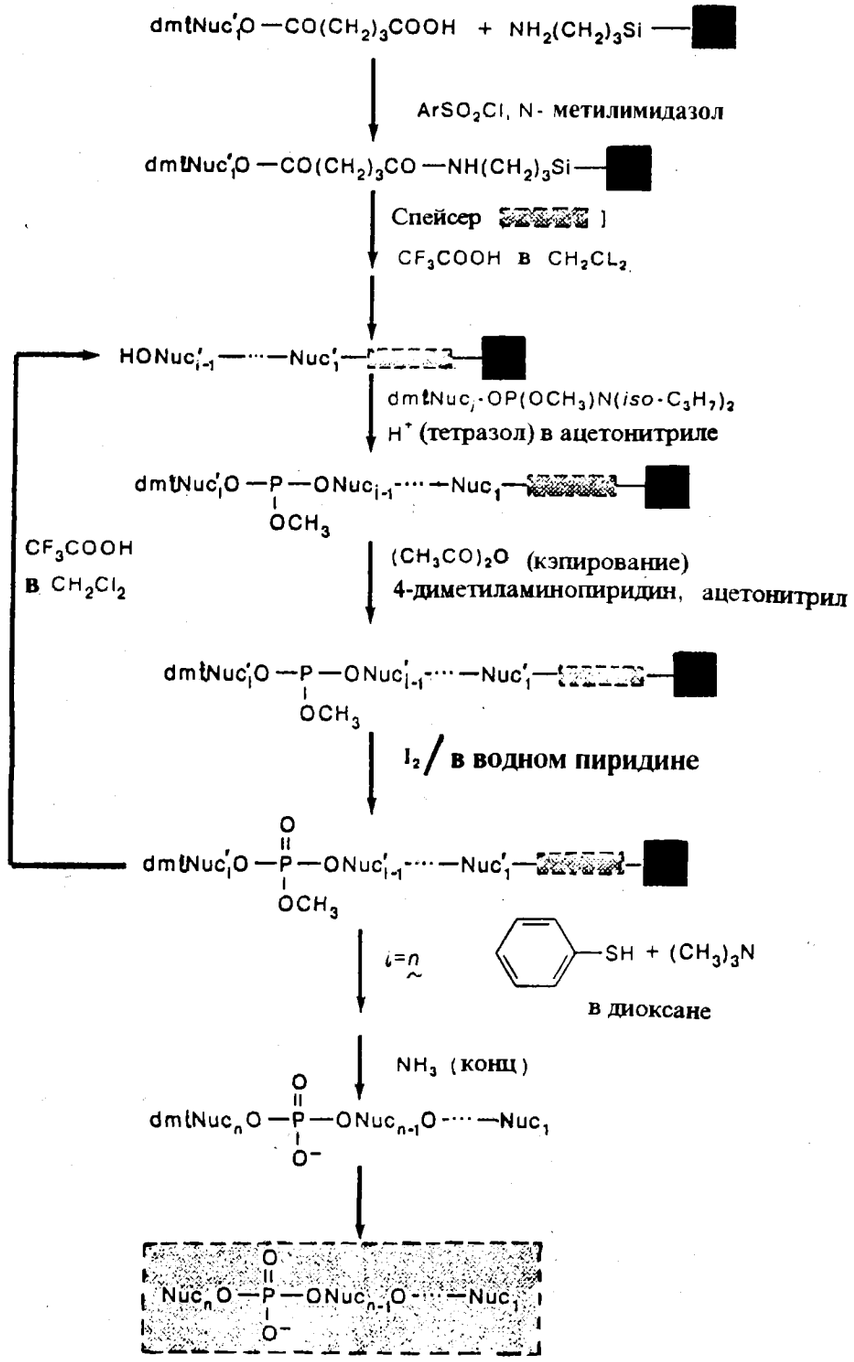


Рис. 82. Схема твердофазного синтеза дезоксирибоолигонуклеотидов фосфитамидным методом:

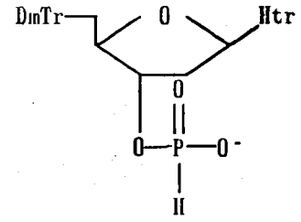
Nuc_i – нуклеозиды; Nuc'_i – нуклеозиды, защищенные по NH_2-группам гетероциклов; dmt – диметокситритильная группа. После каждого цикла i возрастает на единицу, пока не достигнет желаемого значения $i=n$. Стадия кэпирования проводится для превращения следов непрореагировавших 5′-ОН-групп в ацетоксигруппы. После очистки целевого продукта хроматографией диметокситритильная группа удаляется

$$RO-P(OX)-N(i-C_3H_7)_2 + HOR' \rightarrow RO-P(OX)-OR' + NH(i-C_3H_7)_2$$

$$RO-P(OX)-RO' + I_2 + H_2O \rightarrow RO-\overset{\overset{O}{\|}}{P}(OX)-OR' + 2HI \qquad \text{(VII.26)}$$

Метильные и цианэтильные, а также ацильные остатки, защищающие экзоциклические NH_2-группы гетероциклов, удаляются по завершении сборки полной полинуклеотидной цепи.

Другой метод, основанный на фосфитной химии, обычно называют *H-фосфонатным методом синтеза*. В этом методе используются H-фосфонатные синтоны



113

H-фосфонаты активируют обработкой пивалоилхлоридом $(CH_3)_3CC(O)Cl$. Межнуклеозидные H-фосфонатные связи достаточно стабильны и могут окисляться до фосфата по завершении образования полинуклеотидной цепи. Конденсация приводит к H-фосфонат фосфодиэфиру согласно реакции

$$RO-\overset{\overset{O}{\|}}{P}(H)-O^- + (CH_3)_3CC(O)Cl + R'OH \rightarrow RO-\overset{\overset{O}{\|}}{P}(H)-OR' + Cl^- \qquad \text{(VII.27)}$$

Перед каждой стадией конденсации как в фосфитамидном, так и в H-фосфонатном методе остаток DMTr удаляется с растущей полинуклеотидной цепи слабой кислотной обработкой, освобождая 5′-ОН-группу для следующей стадии роста синтезируемой цепи.

Оба метода легко автоматизируются в твердофазном варианте аналогично методу, предложенному для пептидного синтеза Меррифилдом. Более того, фосфитная химия вообще чрезвычайно редко применяется в жидкофазном варианте. В качестве носителя используют главным образом силикагель или пористое стекло. Их обрабатывают так, чтобы ввести аминогруппы, которые в дальнейшем

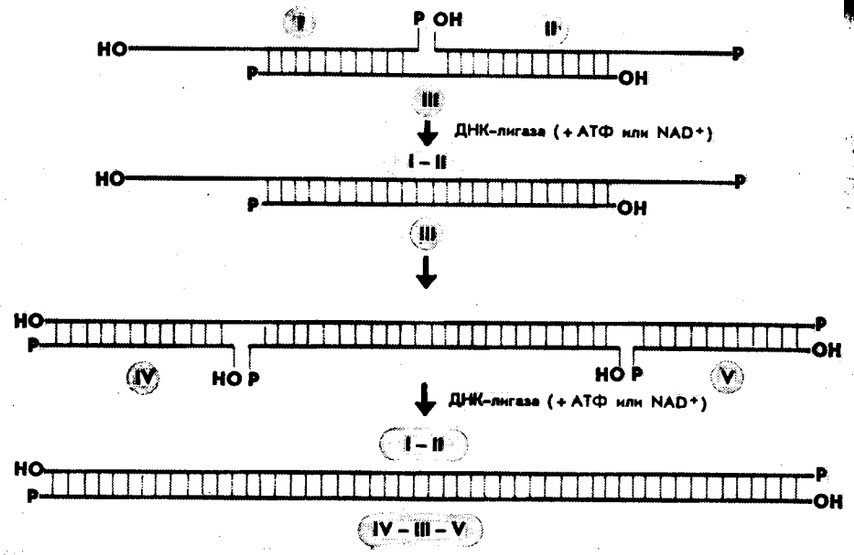


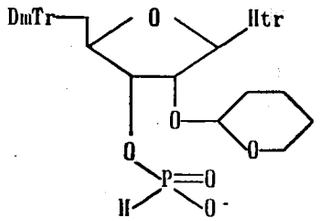
Рис. 83. Схема ступенчатой сборки фрагмента двуспиральной ДНК из олигонуклеотидов I, II, III, IV, V с помощью ДНК-лигазы. Вертикальными линиями показаны комплементарные взаимодействия

взаимодействуют с 3′-концевым нуклеозидом через определенный спейсер, например фрагмент янтарной кислоты. На рис. 82 представлена схема фосфорамидитного синтеза олигонуклеотида.

Хотя оба метода позволяют получать полинуклеотиды длиной до 100 нуклеотидов и более, с их помощью нельзя получить функциональные гены. Поэтому синтетические олиго- и полинуклеотиды, используемые для сборки гена, и в настоящее время сшивают способом, который на заре развития полинуклеотидного синтеза был предложен Г.Корана для соединения 20-мерных олигонуклеотидов, полученных фосфодиэфирным методом (рис. 83). Для соединения олигонуклеотидов I и II используется третий, вспомогательный, нуклеотид III, который комплементарен 5′-концу одного и 3′-концу другого олигонуклеотида, образуя дуплекс с ником. Этот вспомогательный нуклеотид III играет роль матрицы для олигонуклеотидов I и II, причем его 3′-конец комплементарен 3′-концу олигонуклеотида II, а 5′-конец — 5′-концу олигонуклеотида I, несущего фосфомоноэфирную группу. Размер матрицы должен обеспечивать достаточную устойчивость дуплекса с ником, для чего каждый из сшиваемых олигонуклеотидов должен перекрывать матрицу III длиной по 8—10 пар нуклеотидов. Обработка комплекса олигонуклеотидов I, II и III ДНК-лигазой в присутствии доноров остатков AMP (ATP или NAD^+) приводит к сшиванию олигонуклеотидов I и II. Как видно из рис. 83, двуцепочечный фрагмент образуется с выступающими одноцепочечными концами. Эти концы могут быть использованы для дальнейшего наращивания цепи. Для этого необходимо синтезировать олигонуклеотиды IV и V, частично перекрывающие выступающие 3′- и 5′-концевые фрагменты I — II нуклеотида. Обработка комплекса, содержащего олигонуклеотиды I — II, III, IV

и V, ДНК-лигазой приводит к устранению двух ников и образованию двуцепочечной структуры, состоящей из олигонуклеотидов I — II и IV — III — V с выступающими одноцепочечными фрагментами. Очевидно, что процесс можно повторять до тех пор, пока не будет получена ДНК требуемого размера. Дальнейшие манипуляции с синтетическими генами подробно описаны в § 7.11.

Олигорибонуклеотиды можно получать синтетически, используя оба метода, как фосфитамидный, так и H-фосфонатный, и синтоны, содержащие обратимо защищенную 2′-OH-группу. В качестве примера можно привести синтон (114), у которого 2′-OH-группа защищена тетрагидропиранильным остатком:



114

Эта защитная группа достаточно стабильна, выдерживает все промежуточные обработки во время роста олигонуклеотида и легко удаляется по завершении синтеза.

Для синтеза достаточно длинных полирибонуклеотидов широко используют транскрипцию предварительно синтезированных ДНК-дуплексов нужной структуры. Эти дуплексы снабжаются промоторами для используемой при транскрипции РНК-полимеразы, а следующая за промотором транскрибируемая последовательность комплементарна требуемой последовательности в создаваемой РНК. Наиболее широко используются РНК-полимеразы фагов T7 и SP6 (хозяином этого фага является *Typhimurium salmonella*). Эти полимеразы позволяют получить до нескольких тысяч РНК-копий на каждую ДНК-матрицу.

7.11. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

По мере того как становятся доступными в количествах, достаточных для серьезных биологических исследований, различные индивидуальные белки, расширяется видимый спектр их важных практических приложений. В предыдущих параграфах уже упоминались инсулин, необходимый многочисленным пациентам, страдающим диабетом, и нуклеазы, оказавшиеся эффективными противовирусными препаратами. Этот перечень может быть продолжен. Он включает гормон роста, который открывает перспективы существенного повышения продуктивности животноводства; группу родственных белков, известных под названием интерферонов, которые вырабатываются в организме человека и животных при вирусной инфекции и введение которых в организм при заболевании и при эпидемиях дает существенные лечебные и профилактические результаты; ряд белков, стимулирующих определенные этапы иммунного ответа, например интерлейкины, и т.д. Весьма многообещающим для профилактики вирусных заболеваний выглядит создание так называемых субъединичных вакцин, состоящих из вирусных белков и не содержащих нуклеиновой кислоты. Вирусные белки являются главными,

если не единственными, вирусными антигенами, т.е. именно на них вырабатывается иммунный ответ. Два наиболее широко используемых типа противовирусных вакцин представляют собой либо так называемые живые вакцины, либо инактивированный вирус. В первом случае речь идет о способных размножаться в организме пациента вирусах, структура которых изменена таким образом, что они стимулируют образование антител против вируса, но не вызывают заболевания или вызывают его в облегченной форме. Классическим примером является вирус осповакцины, на протяжении более ста лет использовавшийся для создания у людей иммунитета против черной оспы. Получены живые вакцины и против некоторых других опасных заболеваний, например полиомиелита. Однако в случае живых вакцин сохраняется опасность их перерождения в сильные патогены. Наиболее распространенными являются вакцины, полученные инактивацией вирусов путем их облучения или химической обработки, например формальдегидом. Обработка проводится с таким расчетом, чтобы вирус потерял инфекционные свойства, но еще сохранил способность вызывать иммунный ответ. Поскольку возможность сохранения неизменных вирусных частиц должна быть полностью исключена, обработка делается с определенной избыточностью, что резко снижает способность модифицированного вируса стимулировать образование полноценных антител. Использование вирусных белков, свободных от вирусной нуклеиновой кислоты, полностью снимает как опасность перерождения, так и необходимость какой-либо обработки белков, а тем самым и потери снижения их иммуногенности.

Однако существующие способы производства белков, а иногда и их источники в ряде случаев малодоступны. Так, белки, используемые в медицине и предназначенные для введения в организм человека, должны, как правило, быть человеческого происхождения. В противном случае они могут содержать чужеродные антигенные детерминанты и вызывать иммунный ответ. Их многократное применение может вызвать сильную аллергическую реакцию, вплоть до шока и гибели человека. Даже такой небольшой и поэтому обладающий чрезвычайно слабыми антигенными свойствами белок, как бычий инсулин, в отдельных случаях оказывается неприемлемым для многократного применения, и среди больных диабетом существует прослойка, небольшая в процентном отношении, но весьма значительная в абсолютном выражении, которая нуждается в человеческом инсулине. Между тем естественным источником человеческого инсулина может служить лишь трупный материал. Человеческий интерферон получают из лейкоцитов, т.е. его природным источником может служить только донорская кровь, что делает производство интерферона весьма дорогостоящим. Некоторые практически значимые белки, например гормон роста, содержатся в соответствующих тканях в таком ничтожном количестве, что выделение их в производственном масштабе крайне нетехнологично. Вирусные белки можно получать из вирусов, отделяя тем или иным путем нуклеиновые кислоты, но это требует наработки значительных количеств вируса, что сопряжено с высокой вероятностью заражения работников такого производства.

В связи с этим в середине 70-х годов в биотехнологии начало интенсивно развиваться новое направление, предусматривающее создание биологических объектов для производства белков животных и человека вне этих организмов и основанное на введении генов, программирующих соответствующие белки, в генетические структуры одноклеточных, в первую очередь бактерий. Это потребовало

конструирования специальных молекул ДНК, несущих целевой ген и одновременно способных размножаться вместе с бактериальными клетками, чаще всего в клетках *E.coli*, и при этом экспрессировать заложенную в них генетическую информацию. Такое направление биотехнологии получило название *генетической инженерии*, а создаваемые ДНК получили название *рекомбинантных* ДНК. Менее чем за 20 лет генетическая инженерия превратилась в огромную область человеческого знания и его практической деятельности. В рамках общего курса биохимии можно дать лишь некоторые основные представления об этой области.

Чтобы создавать рекомбинантные ДНК, несущие желаемый ген, необходимо прежде всего располагать этим геном. Для этого используют три основных способа. Во-первых, если известна первичная структура белка, получение которого желательно осуществить методами генетической инженерии, можно, основываясь на генетическом коде, построить нуклеотидную последовательность, программирующую этот белок, и осуществить химико-ферментативный синтез гена. Так, например, были осуществлены синтезы нескольких генов, кодирующих различные интерфероны. Во-вторых, можно выделить из тканей, в которых происходит экспрессия гена, информационные РНК, среди которых должна присутствовать и мРНК, кодирующая необходимый белок, провести с помощью обратной транскриптазы синтез *комплементарной ДНК* (сокращенно кДНК) и перевести ее в двунитевую структуру с помощью ДНК-полимеразы. Можно, наконец, вырезать желаемый ген непосредственно из ДНК того объекта, белок которого собираются продуцировать. Два последних подхода не дают сразу же индивидуального гена и требуют предварительного отбора из сложной смеси кДНК или фрагментов хромосомной ДНК. Эта проблема решается уже на уровне клеток микроорганизмов, в которые введены новые наследственные программы, и пути ее решения будут изложены несколько ниже.

После того как исследователь получит материал, содержащий интересующий его ген, он должен ввести его в состав специальных молекул ДНК, которые способны проникать в клетки и автономно размножаться в составе этих клеток. Такие молекулы ДНК получили название векторных молекул или просто *векторов*. В качестве векторов используют чаще всего две группы объектов: плазмиды и вирусы, в том числе бактериофаги. Число векторов, используемых в генетической инженерии, весьма велико, и ознакомиться с ними можно в специальных руководствах по генетической инженерии. Основные элементы используемой в генетической инженерии методологии изложены нами на примере широко используемой плазмиды pBR322, размножающейся в клетках *E.coli*. Эта плазмида придает бактериальным клеткам устойчивость к двум антибиотикам — ампициллину и тетрациклину, поскольку содержит гены, программирующие специальные ферменты, которые катализируют превращение этих антибиотиков в нетоксичные для клетки вещества. Эта устойчивость играет важную роль при последующих генно-инженерных манипуляциях.

Чтобы встроить ген в кольцевую плазмиду, последнюю превращают в линейную двунитевую ДНК обработкой какой-либо эндонуклеазой рестрикции (см. § 7.8), специфичной к единственному участку плазмиды и катализирующей ее расщепление в одном из генов устойчивости к антибиотикам. В случае плазмиды pBR322 это можно, например, осуществить с помощью эндонуклеазы PstI, специфичной к последовательности —d(pCpTpGpCpApG)— и катализирующей гидролиз фосфодиэфирной связи между остатками дезоксиаденилата и дезоксигуанилата

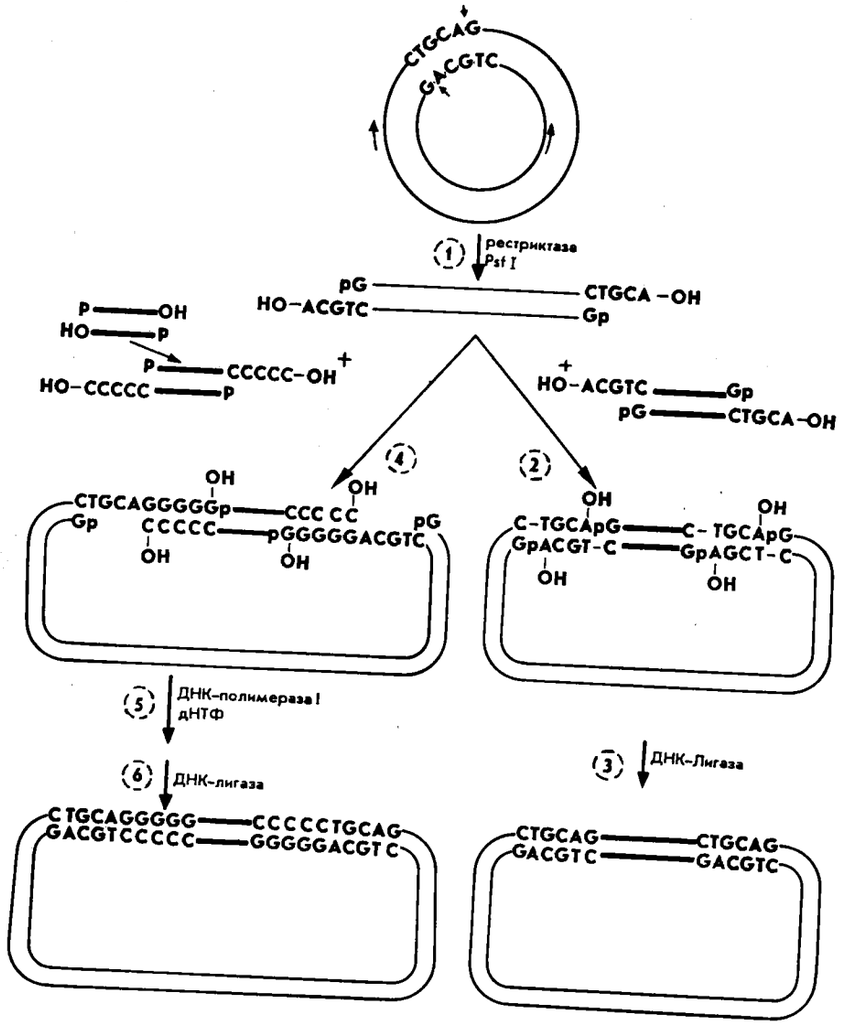


Рис. 84. Схема встраивания гена в кольцевую плазмиду:

1 – превращение кольцевой плазмиды в линейную двунитевую ДНК с липкими концами; *2* – образование комплекса линейной плазмидной ДНК и встраиваемого гена в виде кольцевой структуры с двумя никами; *3* – обработка образовавшегося комплекса ДНК-лигазой; *4* – образование липких концов с помощью терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы у гена в присутствии дЦТФ и у плазмидной ДНК в присутствии дГТФ; *5* – застройка брешки с помощью ДНК-полимеразы I в присутствии всех четырех ДНК; *6* – ликвидация ников с помощью ДНК-лигазы

с образованием 3′-оксигруппы и 5′-концевого фосфата. Это расщепление происходит в гене, ответственном за устойчивость к ампициллину. Образующаяся линейная ДНК имеет так называемые липкие концы, т.е. выступающие с обеих сторон двунитевой структуры однонитевые фрагменты d(pTpCpCpA)—OH. По этим концам может присоединиться олиго- или полинуклеотид, имеющий комплементарную последовательность нуклеотидов, которая в данном случае (это вообще типично для эндонуклеаз рестрикции) индентична липким концам плазмидной ДНК. Такую последовательность может содержать на концах встраиваемый двунитевой ген, если он получен путем химико-ферментативного синтеза, в ходе которого предусмотрены такие конструкции, или двунитевой ген, вырезанный из молекулы ДНК с помощью той же эндонуклеазы PstI. В этом случае возможно образование комплекса линейной плазмидной ДНК и встраиваемого гена в виде кольцевой структуры с двумя никами (рис. 84), который при последующей обработке ДНК-лигазой в присутствии донора аденилата (см. § 5.4) превращается в замкнутую двунитевую ДНК, содержащую встроенный ген.

Если у гена липкие концы нужного строения отсутствуют, то можно их искусственно создать. Удобным для этой цели ферментом является *терминальная дезоксинуклеотидил трансфераза* (выделяемая из вилочковой железы телят), которая катализирует безматричный перенос дезоксинуклеотидных остатков от дезоксинуклеозид-5′-трифосфатов на 3′-концевую гидроксигруппу олиго- или полидезоксинуклеотидов. Как видно из рис. 84, такие концы можно получить, обрабатывая плазмидную ДНК трансферазой в присутствии дГТФ, а встраиваемый ген — тем же ферментом в присутствии дЦТФ. Слипание гена и плазмиды происходит за счет комплементарных олигодезоксигуаниловых и олигодезоксицитидиловых последовательностей, причем образуется кольцевая структура с брешами в каждой нити. Эти бреши могут быть застроены с помощью ДНК-полимеразы I в присутствии смеси всех четырех дНТФ. После этого ники ликвидируются с помощью ДНК-лигазы.

Образование кольцевой плазмиды со встроенным геном в ходе описанных обработок отнюдь не является количественной процедурой. Часть линейных молекул может вообще не образовать никаких кольцевых структур, другая часть — образовать структуры без встраивания дополнительного гена; могут также образоваться комплексы двух или более плазмидных ДНК и т.д. Поэтому необходим отбор плазмид, содержащих дополнительный ген. Этот отбор проводится в ходе процедуры, известной под названием *клонирования*. Этой процедуре предшествует введение полученной смеси ДНК в бактериальные клетки, которые сделаны проницаемыми для двунитевых ДНК путем специальной обработки, например растворами солей кальция или рубидия. В результате получается гетерогенная популяция бактериальных клеток, некоторая, сравнительно небольшая часть которых содержит плазмиды со встроенным геном. Задачей клонирования является отбор именно этих клеток.

Суть клонирования состоит в том, что из каждой клетки по отдельности выращивается популяция клеток, именуемая клоном. В отличие от исходной популяции каждый клон гомогенен, т.е. либо все его клетки содержат плазмиду со встроенным геном, либо все ее не содержат. Техника клонирования достаточно разнообразна, и ниже будет излагаться одна из типовых схем.

Очевидно, что в рассматриваемом случае нужно отобрать те клетки, в которые проникли плазмиды со встроенным геном. Такие клетки должны сохранить способность расти на среде, содержащей тетрациклин, ген которого остался неповрежденным, и утерять способность расти на среде, содержащей ампициллин, поскольку его ген испорчен введенной вставкой. Поэтому разбавленную суспензию клеток, обработанную описанной смесью ДНК, наносят на плоские чашки, в которые залит агаровый гель, содержащий все компоненты, необходимые для

размножения бактерий, и антибиотик тетрациклин. Из каждой клетки, содержащей плазмиду, на такой среде вырастает популяция клеток, именуемая клоном. Из клеток, лишенных плазмиды, на этой среде клоны не вырастут, так как они лишены защитного механизма для обезвреживания тетрациклина. Следующей задачей является отбор тех клонов, в которые произошла встройка гена. Для этого каждый клон проверяют на способность расти на среде, содержащей ампициллин, и отбирают те клоны, которые на такой среде не растут, т.е. у которых ген, ответственный за устойчивость к этому антибиотику, отсутствует. Это и есть клоны, у которых в пределах гена устойчивости к ампициллину произошла встройка дополнительного генетического материала. После отбора клонов со встроенным геном можно размножить клетки этого клона в достаточном количестве, выделить из них плазмидную ДНК и с помощью той же рестриктазы «вырезать» размноженный ген.

Если ген нужен для производства программируемого им белка, то с помощью аналогичных приемов его встраивают в специальным образом сконструированные плазмиды, в которых ген примыкает к эффективно работающему промотору РНК-полимеразы. При введении таких плазмид в соответствующие клетки последние начнут интенсивно нарабатывать информационную РНК, соответствующую этому гену, а с ее помощью и конечный продукт гена — белок. Векторы, используемые для этой цели, называют *экспрессирующими*. Отбор клеток, которые экспрессируют встроенный ген, лучше всего вести непосредственно по накоплению продукта экспрессии в клонах, например используя радиоиммуноанализ или иммуноферментный анализ с мечеными антителами к продуцируемому геном белку.

Нередко возникает задача ввести ген в клетки эукариот, например в дрожжевые клетки, в которых могут нарабатываться белки, прошедшие после их образования необходимые стадии модификации, несвойственные прокариотическим клеткам. Для этой цели используют специальные, так называемые *челночные*, векторы, которые могут автономно размножаться как в прокариотических, так и в эукариотических клетках, например в *E.coli* и дрожжах. В эукариотические клетки плазмиды вводят на заключительных стадиях, поскольку многие предварительные этапы клонирования существенно проще проводить в клетках прокариот.

Главным условием автономной репликации является наличие в составе плазмиды участков ori, т.е. области начала репликации. Эти участки резко отличаются у прокариот и эукариот. Поэтому челночный вектор должен содержать два таких участка.

Если гены получаются в виде фрагментов хромосомной ДНК или в виде комплементарной ДНК, то в подавляющем большинстве случаев первоначально в руках исследователя оказывается чрезвычайно сложная смесь. Так, общепринятый метод выделения информационных РНК эукариот основан на наличии на 3′-конце этих РНК полиаденилловых фрагментов (см. § 5.6). Такие мРНК задерживаются на аффинных сорбентах, содержащих иммобилизованную полиуридиловую кислоту или синтетические олиготимидилаты, в результате комплементарных взаимодействий последних с поли(А) участками мРНК. При осуществлении обратной транскрипции получается смесь комплементарных ДНК (кДНК), соответствующих всему набору мРНК, выделенному из исходной биомассы. После создания на полученных кДНК липких концов осуществляется их встраивание в какой-либо вектор, например в плазмиду pBR322. В итоге получается сложная смесь векторных молекул, содержащих весь набор кДНК. Такие смеси в генетической инженерии называют библиотеками, в данном случае *библиотекой кДНК*. Для нахождения нужного гена в такой библиотеке также используется процедура клонирования. В этом случае после выращивания клонов отбирают те из них, которые производят продукт искомого гена. Отбор может быть проведен с помощью иммунохимических методов. Если имеется информация о первичной структуре какого-либо достаточно протяженного участка гена, то отбор клонов можно проводить с помощью метода молекулярной гибридизации, пользуясь соответствующими синтетическими олигонуклеотидными зондами.

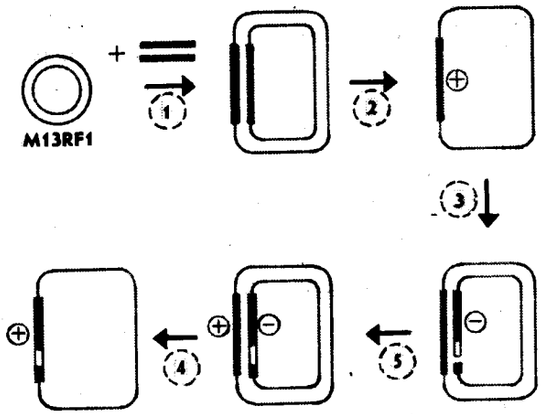


Рис. 85. Схема сайт-специфичного мутагенеза:

1 – встраивание гена в двунитевую репликативную форму ДНК фага M13 (M13RF1); *2* – образование зрелых частиц фага, содержащих однонитевую кольцевую молекулу ДНК (плюс-цепь); *3* – синтез минус-цепи с использованием измененного праймера, содержащего кодирующий элемент заменяемой аминокислоты; *4* – образование замкнутой репликативной формы, содержащей запланированную мутацию; *5* – введение ее в бактериальную клетку и производство плюс-цепей, несущих мутацию в выбранном сайте

Методы генетической инженерии стали важным инструментом биохимических исследований. В частности, они не только открыли возможность получения значительных количеств ранее мало доступных белков, в том числе эукариотических, но и возможность внесения направленных точечных изменений в первичную структуру белков, т.е. замены одного определенного аминокислотного остатка на любой другой произвольно выбранный аминокислотный остаток (в пределах 20 аминокислот, из которых могут строиться полипептидные цепи при трансляции). Это достигается путем замены соответствующего кодона в гене, программирующем исследуемый белок. Такая процедура называется *сайт-специфичным мутагенезом*.

Одна из наиболее употребляемых схем такого мутагенеза приведена на рис. 85. С этой целью исходный ген встраивают в двунитевую репликативную форму ДНК фага M13, зрелые частицы которого содержат однонитевую кольцевую молекулу ДНК (плюс-цепь, см. § 5.7). Введение полученной рекомбинантной ДНК в бактериальные клетки приводит к накоплению частиц бактериофага, содержащих однонитевую рекомбинантную ДНК, из которых ее можно выделить и использовать в качестве матрицы для ДНК-полимеразы. Для репликации используют специально сконструированный праймер, который соответствует участку встроенного гена, содержащему кодирующий элемент заменяемой аминокислоты. При этом по обе стороны от этого тринуклеотида праймер полностью комплементарен рекомбинантной ДНК, а в пределах этого тринуклеотида заменен таким образом, чтобы в образующейся при репликации минус-цепи образовалась запла-

нированная мутация. После превращения комплекса ДНК-праймер в замкнутую двунитевую структуру последнюю снова вводят в бактериальные клетки, в которых начинается производство плюс-цепей, несущих мутацию в выбранном участке (сайте), а затем и формирование мутантных частиц зрелого бактериофага.

Такие направленные изменения в белках (*белковая инженерия*) стали важным инструментом для установления роли отдельных аминокислотных остатков в формировании пространственной структуры белка и выполнении им своих функций. В качестве примера можно привести результаты исследования роли остатка тирозина-248, входящего в активный центр карбоксипептидазы А (см. § 6.1). После установления пространственной структуры этого фермента с помощью рентгеноструктурного анализа высказывалась точка зрения, что гидроксигруппа этого остатка принимает участие в подаче протона на атом азота гидролизуемой пептидной связи и одновременно в удалении протона от молекулы атакующей воды. Однако, когда методом сайт-специфичного мутагенеза была осуществлена замена этого остатка тирозина на фенилаланин, оказалось, что каталитические свойства фермента практически не изменились. Таким образом, роль гидроксигруппы тирозина-248 в катализе не подтвердилась.

Встраивание генов неизвестного строения в ДНК фага М13 приводит к получению ДНК, у которой наряду с хорошо известной последовательностью имеется фрагмент неустановленной структуры. Такая конструкция очень удобна для установления первичной структуры встроенного фрагмента методом Сэнгера (см. § 7.8). Этот подход становится одним из основных для подготовки фрагментов ДНК самого разнообразного происхождения к заключительной фазе секвенирования.

7.12. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Генетическая инженерия открыла новые возможности перед учеными и биотехнологами в значительной мере в результате применения селекционных методов, т.е. отбора клонов микроорганизмов с определенными свойствами. Появление метода амплификации нуклеиновых кислот в последнее время привело к рождению подходов, основанных на селекции нуклеиновых кислот *in vitro*, т.е. на молекулярном уровне (*молекулярная селекция нуклеиновых кислот*). Действительно, если имеется способ среди множества нуклеиновых кислот отобрать такие, которые обладают определенными свойствами, то далее возможно размножить такие нуклеиновые кислоты с помощью амплификации (см. § 7.5) и далее, если требуется, повторить селекцию еще один или несколько раз. Таким образом, все, что требуется для отбора нуклеиновых кислот с заданными свойствами, — это иметь исходный материал для селекции и способ его отделения от остальной массы материала.

Что касается материала для селекции, то получение огромного многообразия нуклеиновых кислот в виде смеси не представляет труда. Для этого достаточно провести синтез, используя на некотором числе этапов смесь всех четырех мономеров вместо индивидуальных мономеров. Это легко сделать на автоматах для олигонуклеотидного синтеза. Этот процесс часто называют рандомизованным синтезом (от англ. random — беспорядочный). Нетрудно оценить, что в 1 мкмоль смеси, содержащей 40-мерные рандомизованные последовательности, будет $4^{40} = 10^{24}$ различных последовательностей, т.е. скорее всего вообще не будет двух одинаковых молекул, поскольку 1 мкмоль содержит всего порядка 10^{18} молекул. В простейшем случае, чтобы в дальнейшем без всяких специальных ухищрений проводить амплификацию, желательно, чтобы рандомизованные последовательности находились между двумя участками с определенной последовательностью, которые после селекции могли бы быть использованы для праймеров.

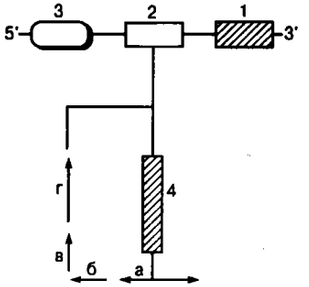


Рис. 86. Схема селекции для получения РНК со сродством к небольшим лигандам:

1 - участок для амплификации ДНК соответствующей продукту синтеза; *2* - рандомизованный фрагмент; *3* - участок для амплификации ДНК; *4* - аффинная колонка с иммобилизованным лигандом; *а* - афинная хроматография и элюция; *б* - обратная транскрипция; *в* - амплификация; *г* - транскрипция

Проще всего представить себе селекцию ДНК на способность связываться с определенными лигандами. Для этого достаточно иммобилизовать лиганд на нерастворимом носителе, например на агарозе, и пропускать полученную смесь большого числа разнообразных нуклеиновых кислот через колонку. Задержанный на колонке материал после элюции может быть амплифицирован и подвергнут следующему циклу селекции.

Метод легко переносится на селекцию молекул РНК (рис. 86). В этом случае на одной из сторон подвергаемой селекции молекулы должен помимо праймера находиться промотор для РНК-полимеразы, например фермента фага Т7. Получаемые ДНК или РНК с заданными свойствами называют *аптамерами*. Повышенный интерес к РНК-аптамерам в значительной степени связан с попытками создать рибозимы с новыми несвойственными природным рибозимам каталитическими характеристиками. Уже описаны РНК-аптамеры для некоторых аминокислот, для аденозина и аденилових нуклеотидов, включая АТФ, для коферментов и кофакторов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях — никотинамидных и флавиновых.

Одно из более сложных применений молекулярной селекции нуклеиновых кислот связано с попытками создать на этой основе рибозимы с новыми каталитическими функциями. С этой целью необходимо создать новые методы селекции. Как уже говорилось в § 6.4, открытие рибозимов вызвало повышенный интерес к возможности участия рибозимов на первых этапах эволюции. Для этой цели необходимы рибозимы с синтетическими функциями. Ниже приводится пример получения с помощью молекулярной селекции нуклеиновых кислот фермента, катализирующего реакцию соединения двух олигорибонуклеотидов, один из которых (донорный) несет на 5′-конце трифосфатную группу, с помощью которой с отщеплением пирофосфата осуществляется образование новой межнуклеотидной связи с 3′-ОН-группой акцепторного олигонуклеотида. Эта реакция по своему типу идентична реакции элонгации полинуклеотидной цепи, в ходе которой осуществляется перенос нуклеотидного остатка от нуклеозид-5′-трифосфата на 3′-ОН-группу растущей полинуклеотидной цепи. Схема селекции представлена на рис. 87. Для большей эффективности этого процесса трифосфатная группа и 3′-ОН-группа донора должны быть сближены. Это можно сделать создав конструкцию (рис. 87, *а*), в которой эти две группы оказываются комплементарными соседним нуклеотидам стебля в шпилечной структуре. На 5′-конце акцепторного

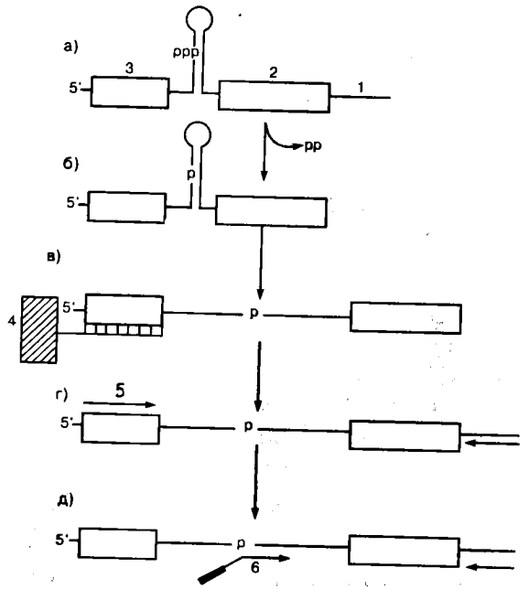


Рис. 87. Селекции рибозима с РНК-лигазной активностью:

1 – 5′-концевой фрагмент донорной РНК; *2* – рандомизованный фрагмент РНК; *3* – акцепторный олигонуклеотид; *4* – аффинная колонка с иммобилизованным олигонуклеотидом, комплементарным 5′-концу акцепторного олигонуклеотида; *5* – праймер для амплификации ДНК, соответствующий продукту синтеза; *6* – праймер для амплификации участка ДНК, кодирующего донорный рибоолигонуклеотид, снабженный промотором для Т7 РНК-полимеразы

олигонуклеотида имеется последовательность, с помощью которой он может сорбироваться на аффинной колонке, содержащей комплементарный этой последовательности олигонуклеотид, иммобилизованный на агарозе.

При смешении обоих олигонуклеотидов небольшая часть донорного материала, обладающая каталитической активностью, соединяется с акцепторным олигонуклеотидом (рис. 87, *б*). Образовавшийся продукт может быть сорбирован на аффинной колонке. При этом, естественно, сорбируется и непрореагировавший акцепторный олигонуклеотид (рис. 87,*а*). После десорбции проводится обратная транскрипция отобранной РНК и полученная ДНК, соответствующая продукту синтеза, амплифицируется (рис. 87, *г*). Так как используемые для амплификации праймеры относятся один к донорному, а другой к акцепторному фрагменту, то ДНК-копия непрореагировавшего акцепторного олигонуклеотида амплификации не подвергается. Таким способом проводится вторая селекция. Для продолжения процесса нужно провести транскрипцию той части амплификата, который соответствует донорной РНК. Для этого проводится повторная амплификация с праймерами, соответствующими концам фрагмента, подлежащего транскрипции, причем праймер, расположенный в области стартовой точки транскрипции, снабжен промоторной последовательностью для Т7 РНК-полимеразы (рис. 87, *д*). После этой повторной амплификации проводится транскрипция и восстанавливается донорный фрагмент, но уже прошедший цикл селекции, т.е. теоретически содержащий только каталитически активный материал, а практически существенно обогащенный по каталитически активным последовательностям. Это дает возможность провести еще один или несколько циклов селекции. В описываемой работе удалось получить рибозим, который катализировал реакцию лигирования с константой скорости 8 $ч^{-1}$, при том что самопроизвольная реакция лигирования в этих условиях характеризуется константой скорости $3 \cdot 10^{-6}$ $ч^{-1}$.

Приведенные примеры наглядно демонстрируют, что метод молекулярной селекции нуклеиновых кислот уже в своем сегодняшнем состоянии позволяет осуществлять целенаправленный поиск среди неисчерпаемого многообразия нуклеиновых кислот структур, способных к связыванию определенных лигандов и рибозимов с новыми типами каталитической активности. Скорее всего это лишь первые шаги нового направления в биохимической технологии.

7.13. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ

Единственным методом, который позволяет определить пространственные координаты большинства атомов биополимера (как правило, всех, кроме атомов водорода), является рентгеноструктурный анализ. Он применим к тем биополимерам, которые могут быть получены в виде кристаллов достаточно большого размера, по крайней мере несколько десятых долей миллиметра. Для биополимеров, имеющих вытянутую периодическую пространственную структуру, например для двунитевых спиральных структур нуклеиновых кислот, геометрические параметры, описывающие основные элементы структуры, могут быть получены исследованием дифракции рентгеновских лучей на ориентированных нитях этих биополимеров. Именно такие данные, полученные для нитей ДНК английскими учеными Уилкинсоном и Розалинд Франклин, позволили Уотсону и Крику предложить пространственную структуру ДНК в виде двойной спирали. Возможность получения белка, нуклеиновой кислоты или их комплекса в виде кристалла достаточно высокого качества является основным ограничением на пути исследования пространственной структуры биополимеров. Одним из факторов, осложняющих кристаллизацию, является неизбежное возникновение конвекционных токов. В связи с этим определенные надежды на улучшение процедур кристаллизации возлагаются на выращивание кристаллов в условиях невесомости на орбитальных космических станциях.

Методы определения координат атомов в кристаллической решетке с помощью рентгеноструктурного анализа хорошо отработаны и продолжают совершенствоваться. В основе их лежит изучение картины дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке. Пучок рентгеновского излучения рассеивается на атомах решетки, причем в результате интерференции лучей, рассеянных в определенном направлении от разных областей решетки, происходит практически полное гашение рассеянного пучка. Взаимное усиление происходит лишь в некоторых определенных направлениях, удовлетворяющих уравнению Лауэ:

$$\vec{S}\,\vec{a} = 2\pi h, \quad \vec{S}\,\vec{b} = 2\pi k, \quad \vec{S}\,\vec{c} = 2\pi l, \tag{7.7}$$

где $\vec{S} = (\vec{s}_0 - \vec{s})$ — разность волновых векторов падающего на кристалл и рассеянного лучей; $\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{c}$ — векторы элементарной ячейки кристалла (рис. 88); h, k, l — целые числа. По определению, модуль волнового вектора равен $2\pi/\lambda$ и, следовательно, модуль вектора $\vec{S}$ может принимать любые значения, не превышающие $4\pi/\lambda$. Рассеянное излучение может быть зарегистрировано либо с помощью рентгеновской пленки, либо с помощью специальных счетчиков рентгеновского излучения. На пленке получается типичная картина (рис. 89), состоящая из

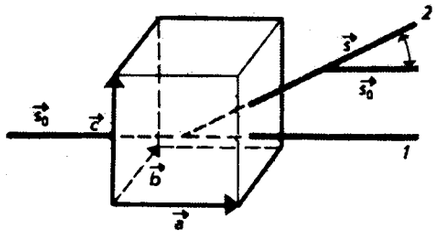


Рис. 88. Схема рассеяния рентгеновского излучения от элементарной ячейки кристаллической решетки с векторами сторон $\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{c}$:

1 – направление падающего пучка; *2* – направление рассеянного пучка; $\vec{s}_0$ и $\vec{s}$ – волновые векторы падающего и рассеянного пучков

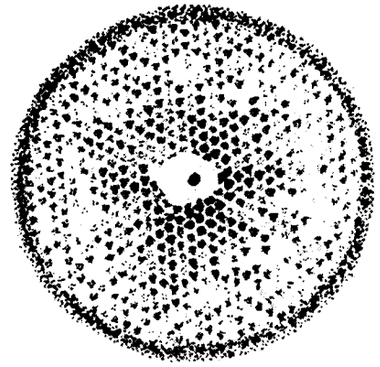


Рис. 89. Фотография рассеянного в одном из направлений рентгеновского излучения, полученная на кристалле эндонуклеазы рестрикции EcoRI (данные Юнга, Модрича, Бэта и Джея)

системы точек, соответствующих по направлению условиям уравнения (7.7). Расположение этих точек дает возможность с помощью уравнения (7.7) определить векторы $\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{c}$, т.е. тип и параметры кристаллической решетки. Меняя направление падающего излучения (практически это делается не изменением положения источника рентгеновского излучения, а поворотом кристалла), можно получить сведения о рассеянных пучках для всевозможных векторов $\vec{S}$. Измеряемой величиной для каждого пучка является интенсивность рассеянного излучения, либо определяемая по почернению пленки, либо измеряемая счетчиком. В результате таких измерений интенсивность получается в виде функции в пространстве вектора $\vec{S}$, т.е. в виде функции трех координат этого вектора.

Основное рассеяние рентгеновских лучей происходит в результате их взаимодействия с внутренними нековалентными электронами атомов вещества. Поэтому интенсивность рассеяния от каждого участка элементарной ячейки определяется величиной электронной плотности в этом участке элементарной ячейки кристалла, которая является функцией координат и может быть записана как $\rho(\vec{r})$, где $\vec{r}$ – радиус-вектор точки, задаваемый ее декартовыми координатами. В этом случае интенсивность рассеяния в направлении, задаваемом вектором $\vec{S}$, оказывается величиной, пропорциональной квадрату модуля фактора рассеяния, который в комплексной форме определяется как

$$F(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{iSr} \mathrm{d}V, \qquad (7.8)$$

где интеграл берется по объему кристалла. Это соотношение связывает функцию $F(\vec{S})$, модуль которой $|F(\vec{S})|$ находят экспериментально из картины дифракции рентгеновских лучей на кристалле, с искомой функцией $\rho(\vec{r})$, дающей положение сгустков электронной плотности в элементарной ячейке кристалла, а тем самым каждого атома, кроме атомов H, не имеющих внутренних электронов.

Как видно из (7.8), функция $F(\vec{S})$ получается преобразованием Фурье функции $\rho(\vec{r})$ и, следовательно, последняя может быть найдена из $F(\vec{S})$ обратным преобразованием Фурье:

$$\rho(\vec{r}) = \int F(\vec{S}) e^{iSr} \mathrm{d}V_S, \qquad (7.9)$$

где интегрирование ведется по всему объему пространства вектора $\vec{S}$, т.е. в пределах сферы радиуса $4\pi/\lambda$. Поскольку функция $F(\vec{S})$ в общем случае является комплексной, ее можно записать как произведение модуля $|F(\vec{S})|$, находимого из эксперимента, и фазового множителя $e^{i\alpha(\vec{S})}$. Так как функция $F(\vec{S})$ дискретна, т.е. отлична от нуля лишь в точках, удовлетворяющих уравнениям (7.8), то (7.9) можно записать в виде

$$\rho(\vec{r}) = \sum_h \sum_k \sum_l |F(\vec{S})| e^{i_0(\vec{S})} e^{-2\pi i \cdot (hx/a + ky/b + lz/c)}. \qquad (7.10)$$

Наиболее сложным моментом при нахождении координат атомов в элементарной ячейке является определение фазовых множителей, соответствующих каждому отраженному от решетки пучку. Эта задача решается по-разному для низкомолекулярных веществ и для биополимеров.

Один из широко используемых для низкомолекулярных соединений приемов состоит в применении функции Паттерсона:

$$P(\vec{z}) = \int_V \rho(\vec{r})\, \rho(\vec{r} + \vec{z}) \mathrm{d}V. \qquad (7.11)$$

Нетрудно убедиться, что функция $P(\vec{z})$ отлична от нуля, только если одновременно $\rho(\vec{r})$ и $\rho(\vec{r} + \vec{z})$ отличны от нуля, т.е. если соответствует вектору, соединяющему два рассеивающих рентгеновское излучение атома ячейки. Вычисление функции Паттерсона проводится с помощью выражения

$$P(\vec{z}) = \frac{1}{8\pi^3} \int_{V_s} |F(\vec{S})|^2 e^{iS\vec{z}} \mathrm{d}V \qquad (7.12)$$

и не требует знания фаз. При небольшом числе атомов знание векторов, соединяющих пары атомов, достаточно для построения пространственной модели молекул, из которых состоит элементарная ячейка.

В рентгеноструктурном анализе биополимеров решающую роль сыграл *метод изоморфного замещения*. Белки и нуклеиновые кислоты не заполняют целиком элементарную ячейку, в ней всегда имеется значительное число молекул растворителя. Это дает возможность в ряде случаев заменить несколько молекул растворителя в кристалле биополимера на вещества, содержащие атомы тяжелых металлов [например, ввести анионы n-$ClHgC_6H_4SO_3^-$ или $AuCl_4^-$, катионы $Hg(NH_3)_2^+$ и т.п.],

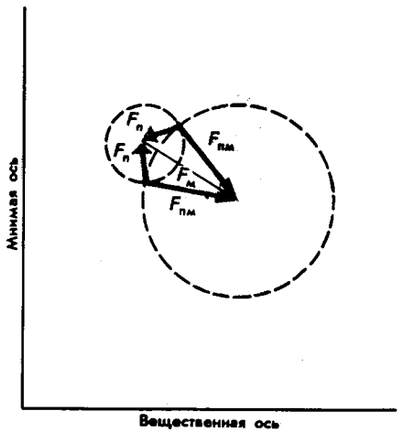


Рис. 90.Схема определения комплексного фактора рассеяния для кристалла биополимера из найденных экспериментально модулей факторов рассеяния кристаллов незамещенного $|F_п(\vec{S})|$ и изоморфно замещенного полимера $|F_{пм}(\vec{S})|$ и комплексного фактора рассеяния $F_м(\vec{S})$ атомов

не нарушая конформации биополимера (изоморфно). Расположение рассеянных пучков рентгеновских лучей для такого изоморфно замещенного кристалла будет совпадать с расположением рефлексов от незамещенных кристаллов, так как параметры ячейки, характеризуемые векторами $\vec{a}$, $\vec{b}$, $\vec{c}$, не изменяются, но значения интенсивности каждого рассеянного пучка претерпевают определенные изменения. Поэтому для каждого пучка определяются две величины, соответствующие кристаллу незамещенного биополимера, $|F_п(\vec{S})|$ и кристаллу биополимера, в котором проведено замещение тяжелым металлом $|F_{пм}(\vec{S})|$. Кроме того, можно определить положение тяжелых атомов в ячейках содержащего тяжелый атом кристалла, вычислив для него функцию Паттерсона. У этой функции на фоне бесчисленного множества максимумов должны резко выделяться максимумы, соответствующие векторам $\vec{z}$, соединяющим пары тяжелых атомов ячейки.

Зная положение тяжелых атомов, можно рассчитать комплексную функцию $F_м(\vec{S})$, характеризующую отдельно рассеяние от этих атомов. Так как факторы рассеяния аддитивны, то $F_{пм}(\vec{S})$ равно сумме $F_п(\vec{S})$ и $F_м(\vec{S})$. В комплексной плоскости эти три величины, представленные в виде векторов, образуют треугольник, у которого известны основание $F_м(\vec{S})$ и размеры двух других сторон. Как видно из рис. 90, на этом основании можно построить всего два треугольника, отвечающих этому требованию, один из которых соответствует комплексным величинам $F_{пм}(\vec{S})$ и $F_п(\vec{S})$. Неоднозначность снимается, если аналогичные измерения провести еще для одного независимого изоморфно-замещенного кристалла биополимера. Знание функции $F_п(\vec{S})$ позволяет по уравнению (7.10) рассчитать функцию $\rho(\vec{r})$. Эту функцию можно наглядно представить в виде серии карт электронной плотности для различных параллельных срезов через элементарную ячейку, на которых изображены системы линий, соединяющих точки с одинаковой электронной плотностью наподобие горизонталей на топографических картах.

В качестве иллюстрации на рис. 91 изображен участок карты электронной плотности белка — цитохрома C_{551} (из микроорганизма *Pseudomonas aeraginosa*), содержащего пиррольные кольца гема. Отчетливо просматриваются максимум электронной плотности (сгущение линий), соответствующий атому Fe, и максимумы, соответствующие пиррольным кольцам. Следует отметить, что в большинстве случаев отдельные атомы на таких картах не прорисовываются. Однако, поскольку геометрия фрагментов хорошо известна из данных по рентгеноструктурному анализу низкомолекулярных соединений, детальное расположение отдельных атомов, как правило, удается вписать в полученное изображение макромолекулы.

Подавляющая часть рентгеноструктурных исследований биополимеров выполнена с использованием в качестве источников рентгеновского излучения монохроматического излучения рентгеновских трубок. В последние годы началось интенсивное использование *синхронного излучения*, возникающего в ускорителях элементарных частиц, где заряженные элементарные частицы (например электроны) движутся по круговой орбите со скоростью, близкой к скорости света, и становятся в соответствии с законами электродинамики источниками интенсивного электромагнитного излучения. Это излучение характеризуется сплошным спектром, из которого с помощью соответствующих монохроматоров можно вырезать излучение желаемой длины волны. Интенсивности синхротронного излучения, достигаемые в мощных ускорителях, существенно превышают величины, достижимые в рентгеновских трубках, что позволяет существенно ускорить сбор информации в рентгеновских дифрактометрах. Кроме того, возможность изменять длину волны и, в частности, проводить измерения так называемого аномального рассеяния вблизи края полосы поглощения рентгеновского излучения рассеивающих атомов позволяет по-новому более эффективно решать проблему фазовых множителей и обходиться без изоморфного замещения.



Рис. 91. Участок карты электронной плотности цитохрома C_{551} из Pseudomonas aeruginosa в плоскости, содержащей гем

7.14. ДВУМЕРНАЯ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Методом рентгеноструктурного анализа монокристаллов установлена детальная пространственная структура сотен белков, значительного числа олигонуклеотидов, нескольких транспортных рибонуклеиновых кислот. Однако встает вопрос, в какой мере установленная структура соответствует той, которая имеет место в функционально активном состоянии биополимера в растворе или в составе живого организма. Априорно нельзя ни исключить, ни оценить масштаб искажения структуры в результате формирования кристаллической решетки. Поэтому весьма существенно располагать независимой информацией о геометрии молекулы биополимера, пусть не столь полной, но зато соответствующей ее состоянию в растворе. Из экспериментальных методов наиболее прочные позиции завоевывают подходы, основанные на использовании *ядерного магнитного резонанса*, в первую очередь ядерного эффекта Оверхаузера.

Известно, что все ядра, имеющие спиновое квантовое число $^1/_2$, в постоянном магнитном поле со значением магнитной индукции B могут находиться в двух независимых состояниях, соответствующих ориентации ядерных магнитных моментов по направлению и против направления поля. Из ядер, входящих в состав биополимеров, такими являются ядра ^1H, ^{13}C и ^{31}P. Разность энергий, соответствующих двум состояниям, составляет $g\beta_N B$, где g — фактор Ланде — без-

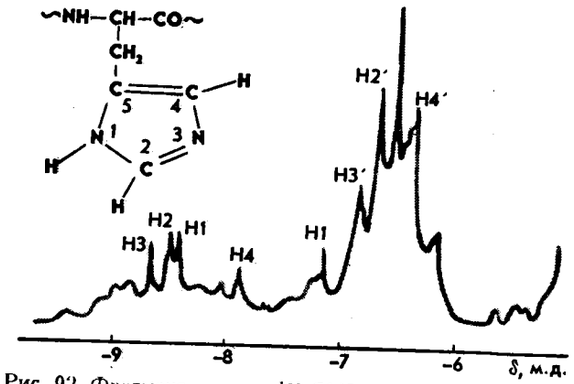


Рис. 92. Фрагмент спектра ^{1}H ЯМР панкреатической рибонуклеазы:

H1 и H1′ – сигналы от атомов H при C2 и C4 имидазольного кольца His-105; H2 и H2′ – то же, для His-119; H3 и H3′ – то же, для His-12; H4 и H4′ – то же, для His-48

размерная величина порядка от нескольких десятых долей единицы до нескольких единиц, имеющая характерное значение для каждого типа ядер (например, для протона $g = 5{,}584$), β_N — константа, называемая ядерным магнетоном и равная $5{,}051 \cdot 10^{-27}$ А·м^2. Поэтому при облучении ядер, находящихся в магнитном поле, радиочастотным излучением с частотой $\nu = g\beta_N B/h$ происходит резонансное поглощение энергии излучения, которое фиксируется как сигнал ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

В наиболее эффективных современных ЯМР-спектрометрах используются поля 10—15 Тл, что в случае протонов соответствует резонансным частотам 400—600 МГц. Так как сами ядра и электроны, составляющие молекулы исследуемого вещества, могут быть источниками локальных магнитных полей, то величина магнитной индукции в точке нахождения некоторого ядра, входящего в состав этих молекул, отличается от величины, создаваемой магнитом ЯМР-спектрометра, на малую, но доступную измерению величину $\Delta B_{\text{лок}}$. Поэтому радиоизлучение с частотой γ поглощается не при индукции внешнего поля, равной $h\nu(g\beta_N)$, а при $B = h\nu(g\beta_N - \Delta B_{\text{лок}})$.

Однотипные ядра, например протоны, в разных частях молекулы имеют разное магнитное окружение и резонируют при различающихся значениях B. Это дает возможность при высокой разрешающей силе ЯМР-спектрометра получить отдельные сигналы для каждой группы однотипно расположенных в молекуле ядер. В качестве примера на рис. 92 приведен фрагмент протонного (^{1}H) спектра ЯМР фермента рибонуклеазы в области, где резонируют протоны, связанные с атомами C2 и C4 имидазольных колец остатка гистидина. Все четыре остатка гистидина, находящиеся в молекуле фермента в положениях 12, 48, 105 и 119, дают отдельные сигналы, отличающиеся на несколько миллионных долей (м.д.) от магнитной индукции, создаваемой магнитом ЯМР-спектрометра.

Условием стационарной регистрации сигнала ЯМР является наличие достаточно быстрой релаксации избыточной энергии, получаемой системой ядер, резонирующих при определенном значении индукции внешнего магнитного поля. Релаксация может происходить как путем передачи энергии на другие спиновые системы (спин-спиновая релаксация), так и на другие степени свободы (спин-решеточная релаксация). В противном случае за короткое время заселенность обоих энергетических уровней выравняется, дальнейшее поглощение энергии прекратится и сигнал ЯМР регистрироваться не будет. Произойдет насыщение системы спинов радиочастотной энергией. В промежуточной области по мере приближения системы к насыщению будет наблюдаться уменьшение интенсивности сигнала.

Частичное или полное насыщение системы спинов i может происходить не только при наложении внешнего радиочастотного поля на резонансной частоте спинов i, но и при насыщающем облучении другой системы спинов j, пространственно сближенных с i в молекулах исследуемого соединения до расстояния не более 5 Å. Эти эффекты связаны с процессами переноса избыточной энергии от спинов j к спинам i по механизму диполь-дипольной кросс-релаксации. При этом чем меньше расстояние между ядрами i и j, тем выше скорость кросс-релаксации между ними, и, следовательно, тем эффективнее перенос энергии от спинов j к спинам i. Таким образом, если пара спинов i и j связана диполь-дипольным взаимодействием, то в условиях селективного насыщающего облучения на резонансной частоте ядер j происходит изменение равновесной заселенности энергетических уровней не только спинов j, но и спинов i, а значит, в ЯМР-спектре помимо полного подавления сигнала ядер j будет наблюдаться частичное изменение интенсивности сигнала ядер i. Такое изменение спектральной интенсивности сигнала ядер i в условиях насыщающего селективного облучения на резонансной частоте ядер j называют *Ядерным эффектом Оверхаузера* (ЯЭО).

Величина ЯЭО$_{ij}$, наблюдаемая между спинами i и j в ЯМР-эксперименте, определяется значением скорости кросс-релаксации σ_{ij} между ними и длительностью времени облучения t:

$$\text{NOE}_i(j) = \sigma_{ij} t. \tag{7.13}$$

В свою очередь, величина кросс-релаксации σ_{ij} для пары спинов i и j представляется как функция времени корреляции τ_c и расстояния r_{ij} между ядрами i и j:

$$\sigma_{ij} = \frac{-\gamma^4 h^2 (\tau_c - 6\tau_c / 1 + 4\omega_0 \tau_c^2)}{2\pi 10 r_{ij}^6}, \tag{7.14}$$

где γ — магнитогирическое отношение для данного типа ядер; h — постоянная Планка; τ_c — время корреляции межспинового вектора $i \longrightarrow j$, ω_0 — частота спектрометра (rad/sec).

Если скорость вращения молекулы во внешнем магнитном поле велика (т.е. время корреляции молекулы τ_c короче, чем $\bar{\omega}_0^{-1}$, где $\bar{\omega}_0$ — резонансная частота), то σ_{ij} положительна, что означает увеличение интенсивности сигнала i в условиях насыщающего облучения сигнала j (ЯЭО$_{ij} > 0$). Эта ситуация характерна для маленьких молекул. В случае больших молекул, характеризующихся медленным вращением с временем корреляции $\tau_c > \bar{\omega}_0^{-1}$, σ_{ij} отрицательна, т.е. уменьшается интенсивность сигнала i в условиях насыщающего облучения сигнала j (ЯЭО$_{ij} < 0$).

В то же время видно, что σ_{ij} (а значит, и ЯЭО$_{ij}$) является резко убывающей функцией расстояния между протонами i и j ($\sigma_{ij} \sim r_{ij}^{-6}$). Поэтому величина ЯЭО

измеряемая в ЯМР-эксперименте при определенном времени облучения t, может дать информацию о скорости кросс-релаксации [см. уравнение (7.13)], а значит, и о расстоянии между определенными ядрами в молекуле [см. уравнение (7.14)]. Таким образом, определяя экспериментально ЯЭО для различных пар ядер исследуемой молекулы, можно получить количественную информацию о геометрии молекулы.

Спектры ЯМР биополимеров, содержащих большое число одинаковых ядер, представлены большим числом перекрывающихся сигналов, и отнести каждый сигнал к определенному атому и оценить его интенсивность для измерения эффекта Оверхаузера является сложной, далеко не всегда выполнимой задачей. Возможности ЯМР-спектроскопии в конформационном анализе биополимеров существенно расширились вследствие разработки новых методик, в частности двумерной (2D) J-корреляционной спектроскопии (COSY — COrrelated SpectroscopY) и ряда ее модификаций и 2D-спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY — Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY).

Любой 2D-ЯМР-спектр может быть представлен в виде диаграммы, построенной в системе координат резонансных частот вдоль вертикальной и горизонтальной осей. 2D-ЯМР-спектр состоит из диагональных сигналов, представляющих собой обычный 1D-ЯМР-спектр, и кросс-пиков, которые располагаются вне диагонали. Именно кросс-пики несут принципиально новую (по сравнению с 1D-ЯМР-спектром) информацию: наличие кросс-пика между любыми двумя ядрами свидетельствует о ЯЭО (в случае NOESY-спектра) или о спин-спиновом взаимодействии (в случае COSY-спектра) между этими ядрами.

В 2D-COSY- и NOESY-спектрах сигналы макромолекул идентифицируют, используя методологию последовательного отнесения сигналов, разработанную для определенных типов макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, олиго- или полисахаридов). С использованием кросс-пиков COSY-спектра ядра, связанные скалярным спин-спиновым взаимодействием, объединяют в соответствующие спиновые системы. Хотя COSY-спектры помогают установить связь между ядрами одной спиновой системы и часто содержат весьма полезную информацию о величинах констант спин-спинового взаимодействия для любых пар J-взаимодействующих ядер, в них отсутствует информация об относительном расположении данной спиновой системы в последовательности биополимера. Эта информация может быть получена из NOESY-спектров путем анализа кросс-релаксационных взаимодействий, которые осуществляются через пространство для ядер соседних остатков биополимера. Эта информация, используемая в комбинации с данными COSY-экспериментов, с учетом известной последовательности биополимера обеспечивает практически полное (или почти полное) отнесение сигналов макромолекулы.

В качестве иллюстрации на рис. 93 приведен фрагмент двумерного спектра ядерного эффекта Оверхаузера короткого дуплекса, образованного двумя комплементарными олигонуклеотидами:

$$(5')\text{—d(pTpGpTpTpTpGpGpC)—}(3')$$
$$(3')\text{—d(ApCpApApApCpCp)—}(5')$$

соответствующего по оси ординат области химических сдвигов протонов гетероциклов H6 пиримидинов и H8 пуринов, а по оси абсцисс — области химических

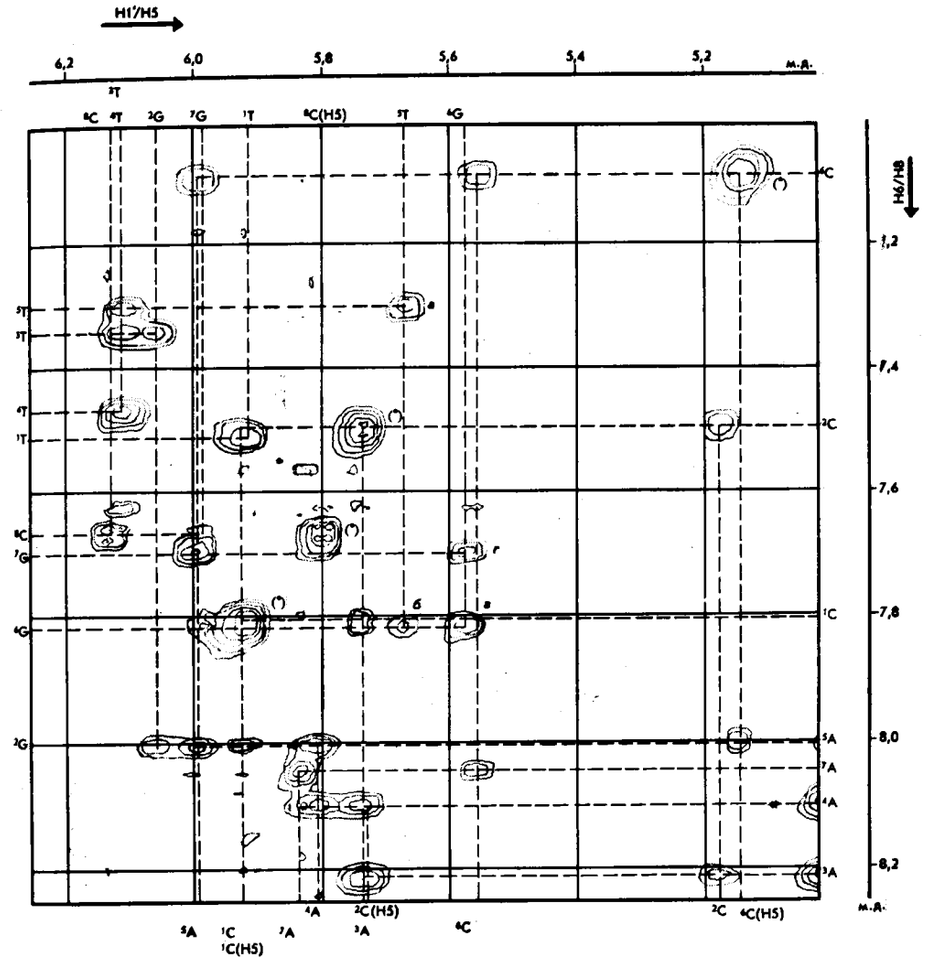


Рис. 93. Фрагмент NOESY-спектра дуплекса, образованного олигонуклеотидами d(pTpGpTpTpTpGpGp C) и d(pCpCpApApApCpA)

Кросс-пики, соответствующие первому олигонуклеотиду, спроектированы на левую вертикальную и верхнюю горизонтальную оси, а для второго олигонуклеотида — на правую вертикальную и нижнюю горизонтальную оси. На осях отмечено, к каким нуклеотидным остаткам относятся сигналы. Остатки пронумерованы отдельно для каждого из олигонуклеотидов с 5′-конца. Интенсивные кросс-пики, отмеченные звездочкой, соответствуют внутринуклеотидным взаимодействиям между протонами H5 и H6 четырех остатков цитидинов

сдвигов протонов при первом углеродном атоме дезоксирибозы H1′. Кросс-пики, соответствующие различным парам взаимодействующих ядер, представлены в виде серии горизонталей, соединяющих точки с одинаковой интенсивностью сигнала. Видно, что каждый протон H1′ взаимодействует с протоном H6 или H8 гетероцикла, принадлежащего тому же нуклеотидному звену, и с протоном гетероцикла соседнего нуклеотидного звена, находящегося со стороны 3′-гидроксп-

группы. Например, кросс-пик *а* характеризует взаимодействие протона H1′ пятого остатка тимидина верхнего олигонуклеотида (нумерация остатков от 5′-конца олигонуклеотида) и H6 этого же остатка, а кросс-пик *б* — его же взаимодействие с H8 шестого остатка дезоксигуанозина. Кросс-пик *в* описывает взаимодействие того же протона H8 с H1′ шестого остатка дезоксирибозы, а кросс-пик *г* — взаимодействие последнего с H8 седьмого остатка дезоксигуанозина.

7.15. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА БИОПОЛИМЕРОВ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Наряду с экспериментальными методами, а в ряде случаев и в сочетании с ними, для изучения пространственной структуры биополимеров начинают использовать расчетные методы, применение которых стало возможным в результате появления сверхмощных компьютеров. Их разделяют на методы молекулярной механики и молекулярной динамики, которые исходят из возможности количественно описать энергию каждого атома в биополимере как функцию внутренних координат его ядер. При этом электроны в явном виде вообще не рассматриваются. Таким образом, просто допускается, что электроны оптимальным образом распределены в пространстве вокруг ядер. Функция, описывающая зависимость энергии от ядерных координат, рассматривается как многомерная поверхность, которую называют поверхностью потенциальной энергии.

В общем случае молекула может иметь много энергетических минимумов, различающихся по глубине. В первом приближении *молекулярной механики* такая молекула характеризуется структурой, отвечающей наиболее глубокому минимуму энергии. Следующее приближение состоит в описании равновесной смеси конформаций, находящихся во всех минимумах энергии в соответствии с распределением Больцмана. Для описания этой поверхности используют эмпирически выведенную систему уравнений, математическая форма которых заимствована из классической механики. Эта система потенциальных функций, называемая *силовым полем*, содержит некоторые варьируемые параметры, числовое значение которых выбирается оптимальным образом так, чтобы получить наилучшее согласие рассчитанных и экспериментальных характеристик молекулы. Метод использует одно общее допущение о возможности переноса соответствующих параметров и силовых постоянных от одной молекулы к другой. Другими словами, эти числовые значения, будучи определены для некоторых простых молекул, используются в дальнейшем в качестве фиксированных величин для других родственных соединений, в данном случае для биополимеров. Таким образом, в методе молекулярной механики молекула рассматривается как набор атомов, взаимодействие между которыми описывается простыми аналитическими функциями, заимствованными из классической механики. Потенциальная энергия в общем виде может быть представлена следующим образом:

$$V = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 + V_6, \qquad (7.15)$$

где V_1 — энергия ковалентных связей как функция расстояний между ядрами; V_2 — энергия, связанная с отклонением от оптимальных валентных углов; V_3 — торсионная энергия, описывающая зависимость энергии от торсионных (двугранных, dihedral) углов; V_4 — энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий между каждой парой атомов; V_5 — энергия взаимодействия между каким-либо атомом и

атомом H, если последний участвует в образовании водородной связи; V_6 — энергия электростатического притяжения или отталкивания между заряженными атомами. Каждый потенциал V является функцией отклонения структурных параметров молекулы от некоторого гипотетического равновесного состояния.

Первый член выражения (7.15), соответствующий потенциалу деформации связей, описывает растяжение валентных связей в молекуле. Хорошим приближением реального изменения потенциальной энергии деформации связей является закон Гука, который часто используют для математического описания этого потенциала во многих типах силового поля:

$$V_1 = \Sigma K_r(r - r_{eq})^2, \qquad (7.16)$$

где K_r — силовая константа; r_{eq} — равновесное значение длины связи, соответствующее минимуму энергии. Суммирование проводят по всем ковалентным связям. Однако при больших деформациях или в случае стерически перегруженных молекул возможны отклонения от гармонического приближения (7.16). Иногда для описания V_1 используют гармонический потенциал с добавлением кубического члена $K_r'(r - r_{eq})^3$:

$$V_1 = \Sigma[K_r(r - r_{eq})^2 + K_r'(r - r_{eq})^3]. \qquad (7.17)$$

Второй член выражения (7.15), V_2, соответствует потенциалу угловой деформации. Математически оно аналогично выражению, описывающему потенциал растяжения связи, и может быть представлено к виду

$$V_2 = \Sigma K_0(\theta - \theta_{eq})^2, \qquad (7.18)$$

где K_0 — силовая константа; θ_{eq} — равновесное значение валентного угла, соответствующее минимуму энергии. Энергия возрастает, если величина валентного угла отклоняется от своего равновесного значения θ_{eq}. В уравнение (7.15) также могут быть включены члены более высокого порядка. Таким образом, согласно основной модели метода, атомы в молекуле как бы связаны вместе отдельными независимыми пружинками, стремящимися сохранить "естественные" величины длин связей и валентных углов.

Третий член выражения (7.15), V_3, соответствует торсионному потенциалу и описывает внутреннее вращение вокруг простых связей в молекуле:

$$V_3 = \Sigma\left[\frac{1}{2}K[1 + \cos(n\varphi - \gamma)]\right], \qquad (7.19)$$

где K — силовая константа; n — коэффициент периодичности; φ — равновесное значение торсионного угла, соответствующее минимуму энергии; γ — фазовый угол.

Комбинацию потенциальных функций, описывающих растяжение связей, угловую деформацию и торсионные взаимодействия, часто называют *валентным силовым полем*. Ван-дер-ваальсовы потенциалы V_4 часто выражают в виде так называемой функции "$^6/_{12}$":

$$V_4 = \sum_{i<j} (B_{ij}/R_{ij}^{12} - A_{ij}/R_{ij}^{6}), \qquad (7.20)$$

где R_{ij} — расстояние между несвязанными атомами; B_{ij} и A_{ij} — параметры ван-дер-

ваальсовых взаимодействий для данной пары атомов. Член R^{-12} описывает отталкивание между атомами; член R^{-6} — притяжение между парами атомов.

В случае взаимодействия протонов, участвующих в формировании водородной связи, с донором неподеленной пары электронов ван-дер-ваальсов потенциал $^{6}/_{12}$ заменяют на потенциал $^{10}/_{12}$:

$$V_5 = \Sigma(C_{ij}/R_{ij}^{12} - D_{ij}/R_{ij}^{10}), \tag{7.21}$$

где R_{ij} — расстояние между ковалентно несвязанными атомами H и донором неподеленной пары электронов, участвующими в формировании водородной связи; C_{ij} и D_{ij} — параметры H—H-взаимодействий для данной пары атомов.

Последний член выражения (7.15), V_6, описывает кулоновские взаимодействия между атомами:

$$V_6 = \sum_{i<j} (q_i q_j/\varepsilon R_{ij}), \tag{7.22}$$

где q_i и q_j — точечные заряды на атомах; ε — диэлектрическая постоянная.

Ниже приведено уравнение, наиболее часто применяемое для описания силового поля и являющееся основой многих расчетных программ для метода молекулярной механики, используемых для конформационного анализа биополимеров:

$$V = \Sigma(K_r(r - r_{eq})^2) + \Sigma(K_\theta(\Theta - \Theta_{eq})^2) + \Sigma\left[\frac{1}{2}K[1 + \cos(n\varphi - \gamma)]\right] +$$

$$+ \sum_{i<j} (B_{ij}/R_{ij}^{12} - A_{ij}/R_{ij}^{6}) + \sum_{i<j} (q_i q_j/\varepsilon R_{ij}) + \Sigma(C_{ij}/R_{ij}^{12} - D_{ij}/R_{ij}^{10}). \tag{7.23}$$

В процессе энергетической оптимизации любая программа по молекулярной механике стартует с некоторых начальных декартовых координат и пытается найти новый выбор координат, соответствующий минимуму потенциальной энергии. Поскольку этот метод позволяет исследовать только ограниченную область пространства, успех расчетов очень сильно зависит от удачного выбора стартовых структур. Построение стартовой структуры базируется на предварительной информации о конформации молекулы, которая может быть получена с помощью экспериментальных методов, описанных в § 7.13, 7.14.

Минимизация энергии проводится путем приписывания координатам стартовой конформации некоторых приращений и вычисления нового значения полученного потенциала V. Если в результате такой процедуры потенциал возрос, то пробуют другой набор приращений координат. Если достигнуто уменьшение потенциала, то испытывается новый набор приращений координат, который должен привести к дальнейшему уменьшению потенциала. Такая пошаговая процедура проводится до тех пор, пока потенциал не станет минимальным, т.е. никакой набор изменений координат не будет приводить к уменьшению величины V.

Если исходить, как это обычно делается, из нескольких стартовых конформаций, то молекулярная механика чаще всего приводит к нескольким конформациям с минимальной энергией. Следующей задачей является отбор тех конформаций, которые согласуются с определенными ограничениями, наложенными имеющимися в распоряжении экспериментальными данными, например, некоторыми расстояниями между протонами, найденными с помощью NOESY ЯМР-спектроскопии, или значениями торсионных углов, найденными из констант спин-спинового расщепления (COSY ЯМР-спектроскопия). В этом случае молекулярную механику называют *ограниченной молекулярной механикой*. С этой целью в выражение (7.15) добавляют некоторую штрафную функцию, которая резко возрастает при отклонении координат от значений, найденных в эксперименте. В том случае, если ограничения привносятся из данных ЯМР-спектроскопии, функционал приводится к виду

$$F = V + E_1 + E_2, \tag{7.24}$$

где два последних слагаемых являются штрафными функциями. Для учета межпротонных расстояний r_0, найденных из эффекта Оверхаузера, вводится функция E_1, которая имеет вид

$$\begin{aligned} E_1 &= k_L(r - r_0)^2 \quad \text{при} \quad r < (r_0 - L_1), \\ E_1 &= 0 \quad \text{при} \quad (r_0 - L_1) \leqslant r \leqslant (r_0 + U_1), \\ E_1 &= k_U(r - r_0)^2 \quad \text{при} \quad r > (r_0 + U_1), \end{aligned} \tag{7.25}$$

где L_1 и U_1 — допустимые отклонения от экспериментальных значений расстояний. Это означает, что если r в процессе вычисления (минимизации энергии) отклоняется вниз от величины r_0 более чем на L_1, то потенциальная энергия начинает искусственно увеличиваться, причем масштаб увеличения задается множителем k_L. То же самое относится и к случаю, если вычисляемая величина r начинает в ходе минимизации энергии превосходить r_0 более чем на допустимую величину U_1.

Аналогичная функция вводится для ограничений на торсионные углы:

$$\begin{aligned} E_2 &= k_L(\varphi - \varphi_0)^2 \quad \text{при} \quad \varphi < (\varphi_0 - L_2), \\ E_2 &= 0 \quad \text{при} \quad (\varphi_0 - L_2) \leqslant \varphi \leqslant (\varphi_0 + U_2), \\ E_2 &= k_U(\varphi - \varphi_0)^2 \quad \text{при} \quad \varphi > (\varphi_0 + U_2), \end{aligned} \tag{7.26}$$

где все величины имеют тот же смысл, что и в предыдущем случае, но применительно к торсионным углам. Коэффициенты в штрафной функции и ограничивающие значения вводятся исследователем, если можно так сказать, интуитивно. Нередко из-за неудачного выбора этих параметров получается нелепый результат, не согласующийся с разумными представлениями об исследуемой структуре. Приходится менять эти параметры и снова проводить процедуру минимизации. Поэтому нередко поиск оптимальной структуры называют компьютерным экспериментом.

В методе молекулярной механики все атомы рассматриваются как бы находящимися в состоянии покоя. В отличие от этого *молекулярная динамика* определяет положение всех атомов в фазовом пространстве координат и скоростей, которое находится путем численного интегрирования уравнений движения Ньютона. В отличие от молекулярной механики молекулярная динамика принимает во внимание тепловое движение атомов. Это позволяет атомам пересекать некоторые потенциальные барьеры, что в принципе отсутствует в молекулярной механике. Чтобы записать систему ньютоновских уравнений, нужно прежде всего определить силу, действующую на каждый атом:

$$F_i = -\partial V/\partial r_i, \tag{7.27}$$

где V — потенциальная энергия, определяемая в уравнении (7.23); r_i — текущая координата атома i, которая в молекулярной динамике является функцией времени.

Ускорение каждого атома i определяется по уравнению

$$a_i = F_i/m_i. \tag{7.28}$$

Кинетическая энергия выражается через скорости движения атомов:

$$K = \sum_{i=1}^{N} m_i v_i^2, \tag{7.29}$$

где m_i и v_i — соответственно масса и скорость (векторная) i-го атома. Полная энергия системы (гамильтониан) определяется в виде

$$\mathrm{H}(r, p) = K(p) + V(r), \tag{7.30}$$

где r — декартовы координаты атомов; p — многомерный вектор механических моментов (импульсов) атомов. Интегрирование системы огромного числа дифференциальных уравнений второго порядка может быть выполнено только численно, а это требует задания начальных условий — начальных значений координат и начальных скоростей. Задание начальных координат может быть сделано, как и в случае молекулярной механики, из экспериментальных данных или из данных оптимизации координат методом молекулярной механики.

Задание скоростей может быть выполнено следующим образом. Каждой температуре соответствует определенное распределение по скоростям, которое для газа описывается уравнением Максвелла. Для большого, но конечного числа атомов, с которым имеют дело в молекулярной динамике, это означает наличие дискретного ряда значений скоростей, которые можно расположить, например, в порядке возрастания. Вопрос состоит в том, какому атому рассматриваемого биополимера какое значение приписать. Обычно это делают с помощью специального генератора случайных чисел. Это означает, что первая скорость приписывается атому с тем номером, который генератор выдал при первом запросе, и т.д. Вначале задается достаточно высокая температура, чтобы система, оказавшаяся в связи с не всегда удачным заданием исходных координат вдали от глубоких минимумов, могла в результате теплового движения пересечь потенциальные барьеры, отделяющие ее от более благоприятных конформаций. Затем температуру понижают до той, при которой хотят получить информацию о молекулярной динамике, и используют то распределение по координатам и скоростям, которое было достигнуто при заведомо высокой, не представляющей биологической значимости температуре.

Следует, однако, отметить, что даже при проведении расчетов без учета влияния окружающих молекул воды и ионов масштаб расчетов таков, что позволяет на самых совершенных компьютерах проследить движение в течение всего лишь долей наносекунды, поскольку временной масштаб некоторых движений (в первую очередь колебаний по достаточно жестким связям) измеряется сотыми долями пикосекунды, а следовательно, каждый шаг численного интегрирования должен составлять небольшое число фемтосекунд. Значит, для достижения времени в 1 нс нужно проводить порядка 10^6 шагов интегрирования системы, которая содержит тысячи дифференциальных уравнений. В то же время, например, конформационные изменения происходят, как правило, в течение микросекунд или даже миллисекунд. Поэтому для объяснения большинства биологических явлений, например направленных конформационных переходов или процессов транслокации при матричном биосинтезе, сегодняшние компьютерные возможности оказываются недостаточными. Однако процесс совершенствования вычислительной техники идет настолько семимильными шагами, что можно надеяться на проникновение методов молекулярной динамики в изучение механизмов важнейших биологических явлений в не очень далеком будущем.

7.16. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Существует широкий спектр физических и химических методов, которые дают определенные сведения о пространственной организации биополимеров и их комплексов. Из физических подходов можно упомянуть группу гидродинамических методов, позволяющих охарактеризовать динамику перемещения молекул биополимера в растворе. Например, если определен коэффициент диффузии биополимера D, то с помощью уравнения Эйнштейна

$$Df = kT \tag{7.31}$$

можно найти коэффициент вязкого трения f. В то же время, согласно уравнению Стокса, величина f_0 для сферической частицы составляет

$$f_0 = 6\pi r\eta, \tag{7.32}$$

где r — радиус сферической частицы; η — вязкость растворителя.

Значение r для биополимера без труда определяется из молекулярной массы и плотности биополимера. Поэтому можно рассчитать величину f_0 исходя из предположения о сферической форме частицы и сопоставить ее с экспериментально найденным значением f. Отклонение f от f_0 является мерой вытянутости молекулы и позволяет вычислить размеры полуосей эллипсоида вращения, моделирующего структуру биополимера.

Важным инструментом исследования пространственной структуры биополимеров является метод *химической модификации*. Если биополимер имеет неупорядоченную структуру, то все однотипные звенья одинаково реагируют с химическими соединениями, реакционноспособными по отношению к этим группам. Если же эта реакция проводится со структурированным полимером, то реакционные группы, находящиеся в глубине молекулы, оказываются частично или полностью защищенными от действия реагента. Обработав биополимер реагентом (этот процесс обычно называют химической модификацией), можно оценить степень превращения каждого остатка и тем самым определить, какие из них находятся на поверхности, а какие частично или полностью экранированы. Например, при обработке панкреатической рибонуклеазы раствором I_2 в водном KI находящиеся в этом растворе анионы I_3^- иодируют остатки тирозина, превращая их в остатки

дииодтирозина. Однако из шести остатков тирозина, входящих в состав фермента и находящихся в положениях 25, 73, 76, 92, 97 и 115 полипептидной цепи, существенно модифицированными оказываются лишь Туг-73, Туг-76 и

Tyr-115. Следовательно, именно они находятся на поверхности молекулы рибонуклеазы, а остальные спрятаны внутри глобулы.

В нуклеиновых кислотах остатки, участвующие в образовании водородных связей с комплементарными гетероциклами, имеют, как правило, резко сниженную реакционную способность по сравнению со свободными гетероциклами. Например, реакция (VII.2) остатков аденина и цитозина с галогенацетальдегидами проходит с участием экзоциклической аминогруппы и атома азота гетероцикла, которые являются непосредственными участниками уотсон-криковских взаимодействий (см. рис. 26). Поэтому в этенопроизводные легко превращаются остатки, находящиеся в однонитевых участках, и существенно труднее — остатки, образующие двуспиральную структуру. Реагенты, различающие одно- и двунитевые структуры полинуклеотидов, широко используются для детального изучения вторичной структуры нуклеиновых кислот, в частности для выявления шпилечных структур. В табл. 7.7 приведены некоторые реагенты, широко применяемые для изучения пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот методом химической модификации.

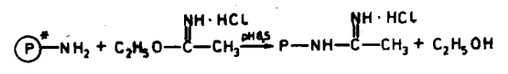
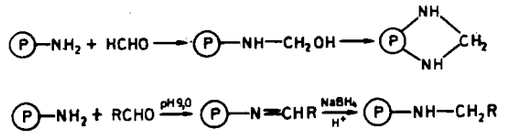
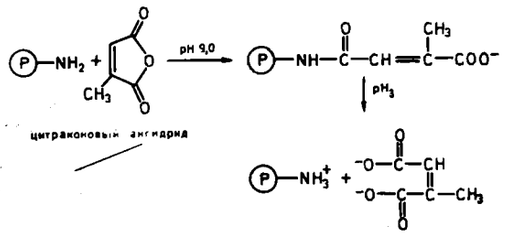
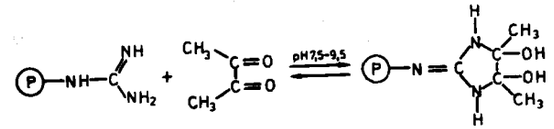
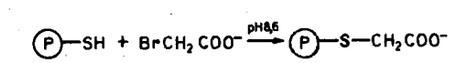
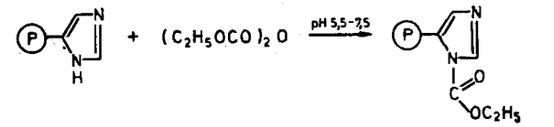
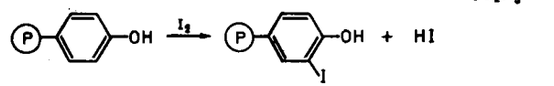
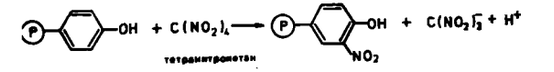
Метод нашел также широкое применение для выявления элементов пространственной организации комплексов биополимеров, в частности комплексов белков с нуклеиновыми кислотами. Если, например, фрагмент нуклеиновой кислоты принимает участие во взаимодействии с белком, то реагент, действующий на свободную нуклеиновую кислоту, не сможет атаковать фрагмент, экранированный молекулой белка. Поэтому на картине, отражающей распределение модифицированных фрагментов вдоль цепи нуклеиновой кислоты, на участке, закрытом белком, будет наблюдаться резко пониженный уровень модификации, своего рода отпечаток белковой молекулы. Этот метод получил название *футпринтинга*, что означает «отпечаток ноги».

Наряду с химической модификацией для тех же целей можно использовать ферменты, катализирующие гидролиз нуклеиновых кислот. Например, в экспериментах по футпринтингу комплексов ДНК с белками часто используют *панкреатическую дезоксирибонуклеазу* (ДНКаза I), которая выделяется в пищеварительный тракт млекопитающих поджелудочной железой. Этот фермент катализирует гидролиз внутренних фосфодиэфирных связей в двунитевых и однонитевых ДНК. При кратковременной обработке ДНК этим ферментом, проведенной так, чтобы в среднем на каждую молекулу ДНК пришелся один разрыв, расщепление приводит к образованию фрагментов самой разнообразной длины, легко регистрируемых с помощью гель-электрофореза. При такой же обработке комплекса ДНК с белком расщепления в участках, экранированных белковой молекулой, не происходит и фрагменты соответствующей длины на электрофореграмме не обнаруживаются. На рис. 94 в качестве примера приведен результат исследования с помощью футпринтинга фрагмента ДНК с ферментом РНК-полимеразой (см. § 2.3). Отчетливо виден участок длиной около 40 нуклеотидов, закрываемый РНК-полимеразой от ДНКазы 1. Он включает 15 нуклеотидных остатков, с которых происходит транскрипция (они обозначены положительными номерами), и предшествующий участок, с которым РНК-полимераза взаимодействует, чтобы зафиксироваться в положении, необходимом для начала процесса транскрипции (промотор, см. § 5.5).

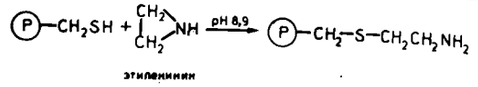
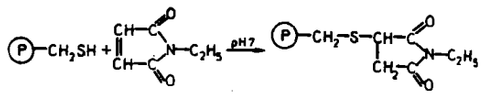
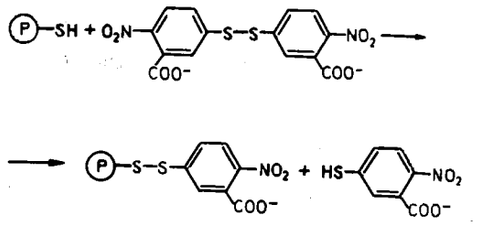
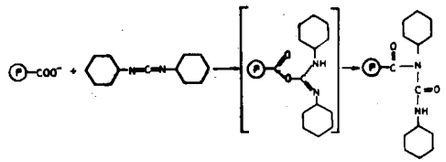
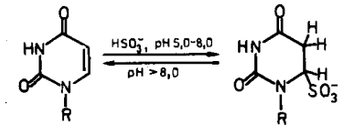
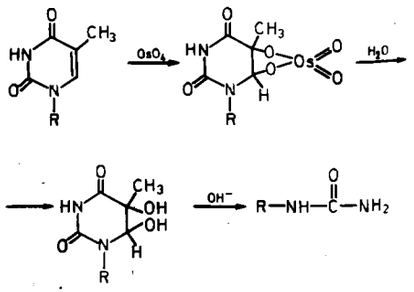
Для изучения пространственной организации комплексов биополимеров широко применяют методы, основанные на сшивании компонентов ком-

Таблица 7.7. Некоторые реагенты, наиболее широко применяемые для изучения пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот

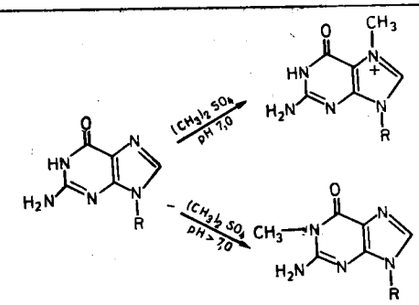
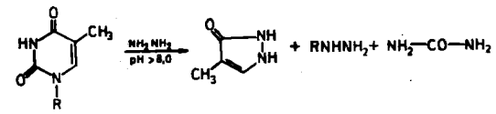
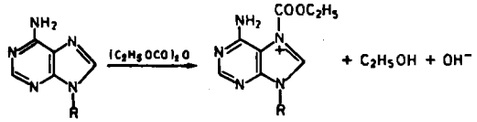
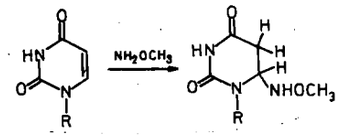
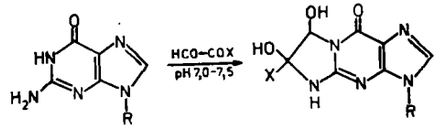
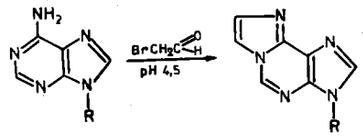
(P - условное обозначение белковой молекулы)

Реагент	Модифицируемая группа	Примеры некоторых реакций
Имидоэфиры	N-Концевая α-аминогруппа, ε-аминогруппа лизина	
Формальдегид, альдегид	N-Концевая α-аминогруппа, ε-аминогруппа лизина	
Ангидриды дикарбоновых кислот	N-Концевая, α-аминогруппа, ε-аминогруппа лизина	
Бутандион	Гуанидиногруппа аргинина	
Бром- или иодуксусная кислота	SH-Группа цистеина, атом серы метионина, атом азота имидазольного кольца гистидина	
Диэтилпирокарбонат	Имидазольное кольцо гистидина	
Иодирование	Остатки тирозина (замещение протона ароматического кольца тирозина)	
Нитрование	Остатки тирозина	

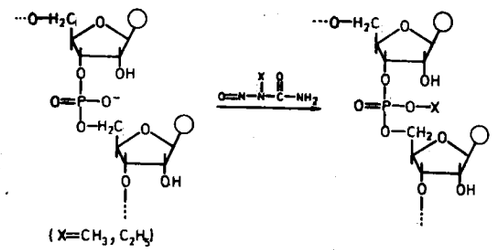
Продолжение табл. 7.7

Реагент	Модифицируемая группа	Примеры некоторых реакций
Аминоэтилирование	SH-Группа цистеина	
N-Этилмалеимид	SH-Группа цистеина, а также остатки гистидина и лизина	
Реагент Эллмана (DTNB) 5,5-дитиобис-(2-нитробензоат)	SH-Группа цистеина	
Дициклогексилкарбодиимид	Концевая карбоксильная группа и карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот	
Гидросульфит натрия	По двойным связям цитозина, урацила и тимина (T < U < C)	
OsO_4	Гидроксилирование двойных связей тимина, урацила, цитозина (T > U > C)	

Продолжение табл. 7.7

Реагент	Модифицируемая группа	Примеры некоторых реакций
Диметилсульфат	Гуанин (N7, N1), аденин (N1, > N7) > N3, цитозин (N3)	
Гидразин	Урацил, тимин, цитозин	
Диэтилпирокарбонат	Аденин, гуанин	
Метиловый эфир гидроксиламина	Урацил, цитозин	
α-Дикарбонильные соединения	Гуанин (N1) и экзоциклическая аминогруппа	 X = H - глиоксаль X = CH_3 - пировиноградный альдегид X = $CH_3CHOC_2H_5$ - 3-этоксибутанол-2-алем-1
Хлор- или бромацетальдегид	Аденин, цитозин	

Продолжение табл. 7.

Реагент	Модифицируемая группа	Примеры некоторых реакций
N-Алкил-N-нитрозомочевина	Межнуклеотидный фосфат, гуанин, аденин, цитозин N7(C) > > N1(A) > N3(C)	

плекса с помощью *бифункциональных реагентов*. Эти реагенты содержат в своем составе две одинаковые или различные группы, способные присоединяться к каким-либо остаткам биополимеров. Например, при обработке рибосом диэтилсуберимидатом, реагентом, содержащим две имидоэфирные группы, атакующие ε-аминогруппы остатков лизина, белки, находящиеся на достаточно близком расстоянии друг от друга, могут оказаться ковалентно связанными (сшитыми). Определяя, какие именно пары белков рибосом оказались сшитыми в результате такой обработки, можно получить ценную информацию о пространственной организации рибосомы. Если бифункциональный реагент может взаимодействовать как с белками, так и с нуклеиновыми кислотами, то с его помощью можно определить, какие именно белки непосредственно связаны с нуклеиновой кислотой в нуклеопротеидах. Так, обрабатывая рибосомы реагентом *транс*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, в котором ионы Cl^-, координированные ионом Pt^{2+}, могут быть замещены на нуклеофильные группы белка (SCH_3 — группа метионина, SH — группа цистеина, имидазольное кольцо гистидина и др.) и азотсодержащих гетероциклов (в первую очередь N7 остатков гуанина), можно определить, какие именно белки в составе рибосомы непосредственно контактируют с рибосомной РНК.

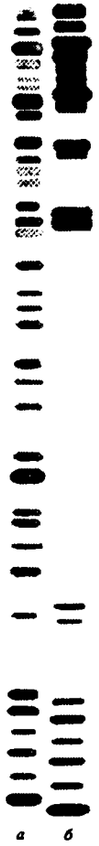


Рис. 94. Электрофореграмма фрагмента двунитевой ДНК, меченого ^{32}P по 5′-концу одной из нитей (матричной):

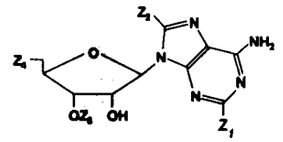
а – исходный фрагмент ДНК, обработанный ДНКазой I; *б* – фрагмент ДНК, обработанный ДНКазой I в присутствии РНК-полимеразы (данные А. Спасского)

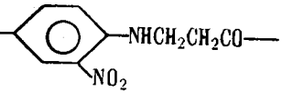
7.17. АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Как уже неоднократно отмечалось, фундаментальным свойством белков и нуклеиновых кислот является их способность узнавать определенные низкомолекулярные соединения или другие полимеры. Результатом узнавания является образование стабильных комплексов с этими лигандами. Обычно это не приводит к изменениям химической структуры биополимера и позволяет неоднократно использовать эти же молекулы биополимера, если это узнавание влечет за собой какие-либо биологические последствия. В то же время отсутствие каких-либо химических последствий означает, как правило, отсутствие каких-либо следов пребывания биополимера в виде комплекса с соответствующим лигандом. Между тем во многих случаях желательно, чтобы такой след остался для определения области биополимера, принимавшей участие в узнавании. В некоторых случаях желательно сделать это узнавание необратимым для того, чтобы повредить биополимер с соответствующими биологическими последствиями. Обе эти проблемы решаются благодаря подходу, известному как *аффинная модификация* (или *аффинное мечение*).

Узнавание основывается на взаимодействии нескольких центров биополимера со специфичным лигандом. Тем не менее в большинстве случаев в лиганде могут быть найдены некоторые центры, которые либо вообще не участвуют в образовании комплекса, либо их изменение существенно не влияет на стабильность комплекса. Эти центры могут быть использованы для присоединения реакционноспособных остатков к лигандам без существенного изменения способности образовывать комплекс с биополимером. Внутри такого комплекса реакционноспособная группировка может оказаться сближенной с определенным остатком биополимера и в дальнейшем ковалентно связаться с реагентом. Следовательно, химическая модификация происходит либо в сайте узнавания, либо в близлежащей области биополимера. Так как эта реакция протекает вследствие сродства (аффинности) лиганда к биополимеру, то этот процесс называют аффинной модификацией. Процесс позволяет ввести радиоактивные, флуоресцентные, парамагнитные и другие метки в определенную область биополимера.

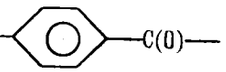
В случае белков не существует разработанных общих принципов конструирования лигандов, специфичных к определенным областям белка. Поэтому конструирование реагентов для аффинной модификации белков чаще всего основывается на знании их специфических лигандов. Таким образом получают производные или аналоги соответствующих субстратов для аффинной модификации каталитических центров ферментов. Также используют аналоги эффекторов для модификации регуляторных центров ферментов. Аналогии прозводные гормонов и нейромедиторов, снабженные реакционноспособными группами, применяют для аффинного мечения соответствующих рецепторов, как, например, реакционноспособные производные и аналоги АТФ, представленные ниже, которые были использованы для аффинной модификации АТФ синтазы (см. § 8.5):



$Z_1, Z_2 = H, Z_3 = N_3$——$NHCH_2CH_2CO$—

NO_2

Z_4=PPP 3′-O-[N(2-нитро-4-азидофенил)-β-аланил]-АТР

$Z_1 = Z_2 = Z_3 = H$, $Z_4 = FSO_2$——C(O)—

5′-*n*-фторсульфонил бензоил аденозил

$Z_1 = N_3$ $Z_2 = Z_3 = H$, $Z_4 = PPP$

2-азидо-АТФ

$Z_1 = H$, $Z_2 = N_3$, $Z_3 = H$, $Z_4 = PPP$

8-азидо-АТФ

Было найдено, что все эти соединения, первые три — при облучении УФ-светом, осуществляют аффинное мечение фермента из разных биологических объектов.

Для аффинной модификации ферментов используют тип реагентов, названных суицидными (реагенты-самоубийцы). Эти соединения сами по себе инертны при мягких условиях, но при воздействии фермента превращаются в реакционноспособный интермедиат, который может вызывать аффинную модификацию. Например, известно, что β-гидроксиацил-СоА под действием фермента β-гидроксидеканоил-АСР гидролазы (3-гидроксидеканоил-[ацилпереносящий белок]дегидратаза ЕС 4.2.1.60) превращается в β,γ-еноил-СоА в результате промежуточного отщепления протона β-H^+ по уравнению

$$R{-}CH_2{-}CHOHCH_2C(O){-}ACP \rightarrow [R{-}CH_2CHO\bar{H}\bar{C}H{-}C(O){-}ACP] \rightarrow$$
$$\rightarrow R{-}CH_2CH{=}CHC(O){-}ACP + OH^- \qquad \text{(VII.28)}$$

Сходные по структуре β,γ-ацетиленовые тиоэфиры узнаются тем же ферментом. Но в этом случае отщепление протона приводит к образованию конъюгированного аллена, который легко алкилирует гистидиновый остаток, находящийся в активном центре фермента:

$$R{-}C{\equiv}C{-}CH_2{-}C(O){-}SR' \rightarrow [R{-}C{\equiv}C{-}\bar{C}H{-}C(O){-}SR'] \xrightarrow{+H^+}$$
$$\rightarrow R{-}CH{=}C{=}CH{-}C(O){-}SR' \rightarrow R{-}CH{=}C(\text{—}CH_2{-}C(O){-}SR')\text{—}EnZ \qquad \text{(VII.29)}$$

В отличие от белков для нуклеиновых кислот как минимум в двух случаях можно подобрать структуру, специфически взаимодействующую с произвольным участком нуклеиновой кислоты. Это, во-первых, участки однонитевых нуклеиновых кислот в областях, где они не образуют сложной пространственной структуры, например шпилек или псевдоузлов. В этом случае такой участок будет узнаваться комплементарным олигонуклеотидом или комплементарным участком нуклеиновой кислоты. Кроме того, если в составе двунитевой нуклеиновой кислоты имеется фрагмент, одна нить которого состоит только из пиримидиновых нуклеотидов, а вторая соответственно только из пуриновых, то, как указывалось в § 3.7, можно подобрать соответствующий пиримидиновый олигонуклеотид, который может образовать тройной комплекс с двуспиральным участком. Более того, после того как для нуклеиновых кислот были развиты методы селекции *in vitro*, открылась перспектива поиска для фрагментов нуклеиновых кислот со сложной пространственной структурой соответствующих аптамеров с достаточно высоким сродством к такой структуре.

Олигонуклеотиды или нуклеиновые кислоты, способные взаимодействовать с определенными, имеющими биологический смысл участками нуклеиновой кислоты, называют антисмысловыми. Использование таких *антисмысловых структур* может привести к подавлению биологической функции соответствующей нуклеиновой кислоты-мишени, в связи с чем на них возлагаются большие надежды как на потенциальные противовирусные и противоопухолевые средства (в частности, в связи с проблемой СПИДа). Развитие таких подходов стало в последнее время одной из наиболее бурно развивающихся областей биотехнологии.

Одним из вариантов применения антисмысловых подходов является аффинная модификация нуклеиновых кислот. Поскольку принципы формирования двуспиральных и трехспиральных структур в настоящее время хорошо известны, не представляет труда выбрать в олигонуклеотидах точки, несущественные для образования таких структур. Например, присоединение реакционноспособных групп по концевому фосфату не должно приводить к нарушению взаимодействий между цепями, поскольку эти взаимодействия обусловлены в основном образованием водородных связей между гетероциклическими фрагментами. Более того, как видно из рис.

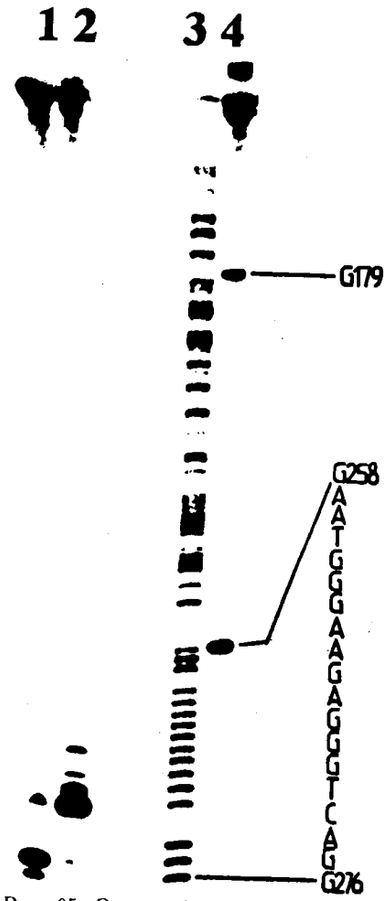


Рис. 95. Электрофореграмма реакционных смесей после модификации алкилирующими производными 303-звенного одноцепочечного фрагмента ДНК. Реакционная смесь обрабатывалась пиперидином для расщепления ДНК по точкам алкилирования:

1, 2, 4 – продукты деградации фрагмента ДНК, полученные после алкилирования реагентами B, C и A; *3* – продукты деградации фрагмента ДНК по пуриновым нуклеотидам (маркер для определения положений расщепления)

26, введение заместителей, в том числе реакционноспособных групп, в 5-положение пиримидиновых гетероциклов не должно нарушать комплементарные взаимодействия в двунитевых структурах.

Определение модифицированного остатка внутри биополимера с известной первичной структурой является конечной и наиболее трудоемкой стадией эксперимента. Обычным способом определения (локализации) модифицированного остатка в белке является первоначально ферментативное или химическое расщепление биополимера на небольшие пептидные фрагменты, разделение их методом электрофореза, изоэлектрическим фокусированием или хроматографически и идентификация модифицированного пептида. Идентификацию провести достаточно легко, так как модифицированный пептид смещается относительно немодифицированного в стандартной системе разделения. Далее может быть проведена процедура ступенчатой деградации по Эдману до тех пор, пока на одной из ступеней не образуется фенилтиогидантоиновое производное с характеристикой, например хроматографической подвижностью, не свойственной фенилтиогидантоинам известных аминокислотных производных.

Этот подход не всегда приводит к желаемому результату из-за различных осложнений: многообразие модифицированных сайтов, обусловленное подвижностью первоначального комплекса белка с реагентом, приводящей к неоднозначной фиксации реагента на белке-мишени; нестабильность продукта модификации на стадии разделения или деградации по Эдману и др.

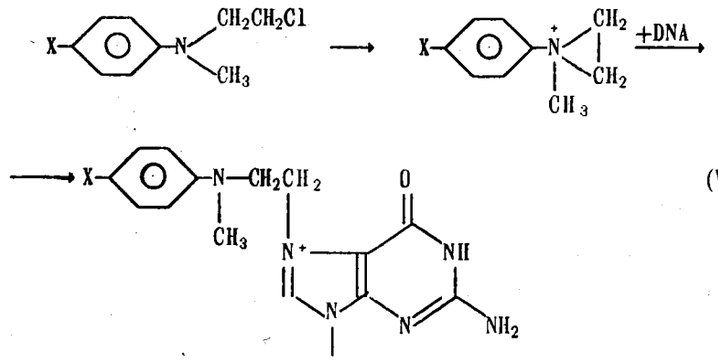
Локализация сайтов модификации в нуклеиновых кислотах обычно проводится методом, сходным с тем, который применяется при секвенировании ДНК методом Максама—Гилберта. Нуклеиновая кислота (мишень) метится ^{32}P по одному из концов. После аффинной модификации реакционноспособным производным антисмыслового олигонуклеотида мишень обрабатывают так, чтобы разрушить межнуклеотидную связь в модифицированном сайте. На радиоавтографе, полученном после электрофоретического разделения, появляются полосы, соответствующие фрагментам мишени, расположенным между ^{32}P-меченным концом и точкой расщепления. Положение полосы соответствует длине фрагмента и, следовательно, указывает на расстояние между точкой расщепления и меченым концом и тем самым указывает на положение модифицированного остатка. В качестве примера на рис. 95 представлены результаты аффинного алкилирования одноцепочечной ДНК, состоящей из 303 нуклеотидов. Для алкилирования использовали следующие реагенты:

d(ApCpCpCpTpCpTpTpCpCpCp)rA > ClRCl **A**

ClRCH$_2$NHpd(ApCpCpCpTpCpTpTpCpCpCp)rA **B**

ClRCH$_2$NHd(CpCpTpCpTpTpCpCpCp)rA **C**

где RCl — p-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)фенил — остаток, образующий высокореакционноспособный промежуточный этиленаммониевый катион, который алкилирует нуклеофильный центр мишени, преимущественно гуанины по N7-положению в соответствии со схемой



(VII.30)

где X — олигонуклеотид со спейсером, соединяющим RCl с олигонуклеотидом.

Участок мишени, по которому проходила модификация, имел структуру

—d(CpGpTpGpCpCpTpTpGpApApTpGpGpGpApApGpApGpCpGpGpTpCpApGpGpTpTpCpC)—

250 260 270 280

(номера указывают расположение нуклеотидных остатков во фрагменте ДНК).

Олигонуклеотиды, составляющие вышеуказанные реагенты, образуют комплементарные комплексы с нуклеотидами 261—274 (A и B) или 261—270 (C) мишени. Как видно из рис. 95, реагент A с реакционноспособной группой, присоединенной к аденозину, образующему Уотсон-Криковскую пару с основанием 261, алкилирует преимущественно G-258; реагент с группой, присоединенной к pdC, образующий пару с G-275, модифицирует главным образом этот же гуанин; реагент C с группой на pdC, взаимодействующей с G-270, большей часть алкилирует G-271 и G-272. Во всех этих трех случаях реакция протекает избирательно в той области, где находится реакционноспособная группа.

При изучении субъединичных белков и нуклеопротеидов аффинная модификация дает возможность понять, какие субъединицы участвуют в узнавании специфических лигандов. Эта проблема существенно проще, чем точная локализация точек модификации. Субъединицы как белков, так и нуклеиновых кислот обычно идентифицируются в соответствии с их положением на хроматограмме, электрофореграмме, при изоэлектрическом фокусировании в зависимости от выбранной системы деления. Присоединение метки обычно не изменяет существенно положение макромолекулы в таких системах. Следовательно, проблема заключается в том, чтобы обнаружить среди разделенных субъединиц ту, которая содержит введенную метку. Трудности возникают в тех случаях, когда в качестве лиганда, несущего реакционноспособную группу, берется полимер. Например, при изучении локализации транспортных РНК на рибосомах или на субъединицах аминоацил-тРНК-синтетаз возможно использование реакционноспособных производных тРНК. Присоединение молекул, несущих большой отрицательный заряд, может привести к сильному изменению положения модифицированного белка в используемой системе разделения. Следовательно, прежде чем проводить разделение, необходимо удалить специфическую макромолекулярную часть из модифицированного материала без разрушения связи метки с соответствующей субъединицей.

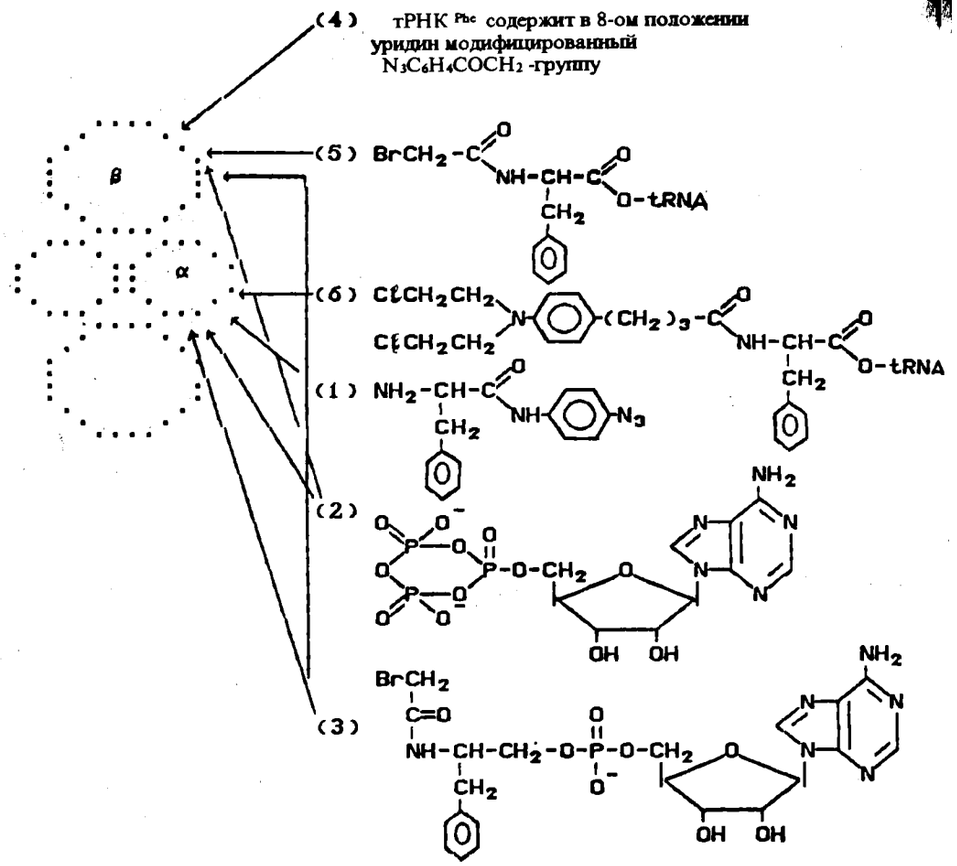


Рис. 96. Расположение активных центров между α- и β-субъединицами фенилаланил-тРНК синтетазы из *E.coli*

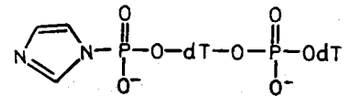
Из-за маленького количества каждой фракции чувствительность должна быть **на уровне** радиоактивного или флуоресцентного метода. При использовании полимерного лиганда, который необходимо удалять, надо, чтобы метка находилась в самой реакционноспособной группе, а не в удаляемой полимерной части аффинного реагента.

Приведем в качестве примера распределение активных центров между α- и β-субъединицами фенилаланил-тРНК синтетазы из *E.coli* (рис. 96). Этот фермент катализирует связывание фенилаланина с $тРНК^{Phe}$ в присутствии ATP в качестве донора энергии (см. § 5.6). В качестве промежуточного соединения образуется фенилаланиладенилат. Из рис. 96 видно, что фотореакционноспособный *п*-азидофенилаланин, аналог фенилаланина, модифицирует α-субъединицу. Аденозин-5′-триметафосфат, аналог ATP, и N-бромацетилфенилаланиладенилат, аналог промежуточного соединения, модифицируют как α-, так и β-субъединицу. Это означает, что соответствующие активные центры локализуются в области контакта

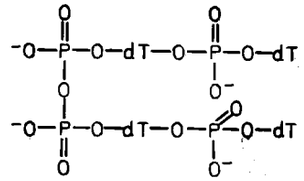
субъединиц, позволяя реагентам атаковать обе субъединицы. Производные тРНК, содержащие фотореактивные азидогруппы внутри остатка тРНК (тРНК, обработанная $N_3C_6H_4COCH_2Br$, чтобы проалкилировать остаток тиоуридина по положению 8), и N-α-бромацетилфенилаланил-тРНК ($BrCH_2CO-Phe-tRNA$) модифицировали β-субъединицу. Однако аналогичное производное, но с существенно большим реакционноспособным остатком, присоединенным к α-NH_2-группе, — хлорамбуцил—Phe—tRNAp—$(ClCH_2CH_2)_2N-C_6H_4-(CH_2)_3-C(O)-Phe-tRNA$ — модифицирует главным образом α-субъединицу. Это означает, что остаток тРНК с присоединенным фенилаланином локализуется на β-субъединице, но не слишком далеко от границы субъединицы, позволяя таким образом длинному остатку достигнуть α-субъединицы.

Задачи

7.1. Синтез ряда производных олигонуклеотидов проводят, активируя концевой 5′-фосфат имидазолом. В ходе получения P-имидазолида



образуется побочный продукт — дизамещенный пирофосфат:



На рис. 97 приведен профиль элюции полученной реакционной смеси при анионообменной хроматографии. Определите, какому соединению соответствует каждый пик, и оцените выход основного продукта реакции.

Количество вещества, вышедшего с колонки, пропорционально площади пика, которая рассчитывается как произведение высоты на ширину на полувысоте пика.

7.2. Для определения молярного коэффициента поглощения гексадекануклеотид pd(T—G—A—C—C—C—T—C—T—T—C—C—C—A—T—T) был подвергнут полному ферментативному гидролизу до нуклеозидов. Оптическая плотность раствора олигонуклеотида до гидролиза при длине волны 260 нм была 1,5036, после гидролиза в той же кювете она составила 1,8585. Определите молярный коэффициент поглощения при 260 нм для данного олигонуклеотида, если молярные коэффициенты поглощения для нуклеозидов при 260 нм следующие ($M^{-1}\cdot см^{-1}$): $\varepsilon_A = 15{,}4\cdot10^3$; $\varepsilon_C = 7{,}4\cdot10^3$; $\varepsilon_G = 11{,}5\cdot10^3$; $\varepsilon_T = 8{,}7\cdot10^3$.

7.3. Для выделения эндонуклеазы рестрикции SfaN1, узнающей последовательность —GCATC—
—CGTAG—, использовали аффинную хроматографию. С этой целью к полимерному носителю был ковалентно присоединен через 5′-концевую фосфатную группу один из

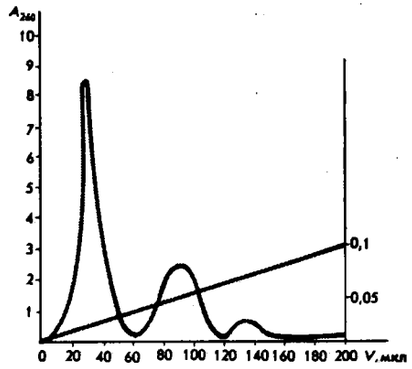


Рис. 97. Профиль элюции реакционной смеси, полученной при синтезе Р-имидазолида d(pTpT) при анионообменной хроматографии

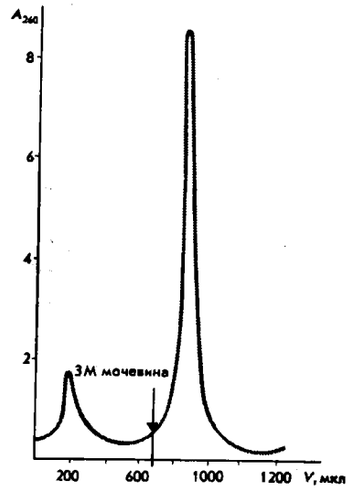


Рис. 98. Профиль элюции с аффинного сорбента олигонуклеотида II при элюировании 3 моль/л раствором мочевины

олигонуклеотидов дуплекса, а именно pTTGGATGACGCATCTT (I). При добавлении комплементарного олигонуклеотида pAAGATGCGTCATCCAA (II) происходит образование комплекса и формируется сайт узнавания для рестриктазы. Для аффинной колонки предварительно определяют емкость по сорбируемому олигонуклеотиду (единица оптической плотности — о.е. — соответствует количеству поглощающего вещества, которое, будучи растворено в 1 мл растворителя в кювете с толщиной слоя 1 см, дает величину оптической плотности 1). Для этого на колонку, содержащую 15 мг аффинного сорбента, наносят 3 о.е. второго олигонуклеотида в условиях образования дуплекса. Колонку промывают 3М мочевиной (денатурирующие условия), комплекс разрушается, и весь связавшийся олигонуклеотид элюируется с колонки. На рис. 98 представлена хроматограмма. Известно, что скорость движения бумажной ленты 2 мм/мин, скорость элюции 50 мкл/мин.

Рассчитайте количество связавшегося олигонуклеотида и емкость сорбента.

7.4. Для исследования химической модификации ДНК в составе хроматина используют меченый [^{32}P]-олигонуклеотид, содержащий на концевом фосфате алкилирующую группу. Какова должна быть удельная активность меченого олигонуклеотида, чтобы можно было детектировать модификацию 0,1 о.е. ДНК ($\varepsilon = 7 \cdot 10^3 M^{-1}см^{-1}$ нуклеотид), если известно, что степень модификации (отношение количества реагента к количеству нуклеотидов в ДНК) не ниже 10^{-6}? Для модификации использовали производное гексадекатимидилата $(pdT)_{16}$ ($\varepsilon = 155 \cdot 10^3 M^{-1}см^{-1}$). Эффективность света 40%, фон счетчика 20 импульсов в минуту. Счет образца должен превышать фон не меньше чем в 10 раз.

7.5. Для диагностирования инфаркта миокарда определили концентрацию миоглобина в сыворотке крови трех пациентов с использованием антител, содержащих флуоресцентную метку (комплекс Eu^{III}). Флуоресценцию измеряли на флуориметре, работающем как счетчик фотонов. Предварительно была измерена флуоресценция для образцов, содержащих известное количество миоглобина, получены следующие результаты:

Концентрация миоглобина, мг/мл	0(фон)	31,20	62,00	125	250	500	1000
Относительная интенсивность флуоресценции . . .	5057	43,235	76 550	133 675	238 347	427 101	743 121

Постройте калибровочную кривую в логарифмических координатах и определите концентрацию миоглобина в сыворотке крови пациентов, если были получены следующие относительные интенсивности флуоресценции: 31 844, 79 763, 608 174.

7.6. Для определения аминокислотной последовательности рибосомальный белок L32 был расщеплен на фрагменты двумя различными методами (А, Б) и для полученных фрагментов методом Эдмана была определена первичная структура. Для метода А получены 12 фрагментов:

1. CAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVW
2. LVHNVKELEVLLMCNKSY
3. MAALRPLVKPKIVKKRW
4. RKPRGIDNRVRRRF
5. NPNARLRSEENE
6. KGQILMPNIGY
7. KHMLPSGF
8. IRHQSDRY
9. VKIKRNW
10. GSNKKW
11. RKF
12. KKF

Для метода Б получено 4 фрагмента:

1. MAALRPLVKPKIVKKPWKKFIRHQSDRYVKIKRNWRKPRGIDNRVRRRFKGQILM
2. CNKSYCAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVWNPNARLRSEENE
3. LPSGFRKFLVHNVKELEVLLM
4. PNIGYGSNKKWKHM

С помощью каких методов было проведено расщепление белка? Воспроизведите аминокислотную последовательность рибосомального белка L32, исходя из двух наборов фрагментов, полученных разными методами. Сколько пептидных фрагментов будет получено, если белок подвергнуть расщеплению гидролитическим ферментом трипсином?

7.7. Определение молекулярной массы фермента фенилаланин-тРНК-синтетазы из *Thermus thermophilus* проводили двумя методами: гель-фильтрацией на декстрановом геле Sephacryl-S-300 шведской фирмы «Pharmacia» и гель-электрофорезом на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Молекулярная масса M нативного белка при определении гель-фильтрацией найдена равной 245 кДа*. В денатурирующих условиях при гель-электрофорезе белок разделился на две полосы. Для определения молекулярной массы этих полипептидов в денатурирующих условиях проводили гель-электрофорез калибровочных белков (т.е. белков с известной молекулярной массой). Для

*Дальтон (Да, или Da) — единица молекулярной массы биополимера, равная $^1/_{12}$ массы атома ^{12}C (1 дальтон = $1{,}661 \cdot 10^{-24}$ г).

всех белков из результатов гель-электрофореза были определены относительные значени R_f электрофоретической подвижности относительно белка химотрипсиногена (белок наименьшей массой). Для калибровочных белков получены следующие значения R_f.

Белок	Молекулярная масса, кДа	R_f	Белок	Молекулярная масса, кДа	R_f
Химотрипсиноген	25	1	σ-Субъединица	90	0,49
α-Субъединица РНК-полимеразы	40	0,81	Миозин	220	0,16
β-Субъединица	155	0,29	Каталаза	60	0,69
			Овальбумин	45	0,82
β'-Субъединица	155	0,31			

Для R_f определяемых белков получены значения 0,49 (α-субъединица) и 0,84 (β-субъединица). Интенсивности окраски полос красителем, используемым для проявления белков, относятся приблизительно как 1:2. Постройте калибровочную кривую в координатах $\lg M - R_f$. Определите молекулярную массу неизвестных белков. Что можно сказать о субъединичном составе фенилаланин-тРНК-синтетазы?

7.8. Для рибосомного белка S2 малой субъединицы печени крысы получены значения константы седиментации 2,12S, коэффициент диффузии $D = 5{,}88$ см^2/с и парциальный удельный объем $\bar{V} = 0{,}739$ мл/г. Найдите молекулярную массу белка и отношение f/f_0 найденного коэффициента вязкого трения к рассчитанному по уравнению Стокса.

ГЛАВА 8

ОСНОВЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ

Живые организмы представляют собой термодинамически неустойчивые системы. Для их формирования и функционирования необходимо непрерывное поступление энергии в форме, пригодной для многопланового использования. Поскольку временной масштаб биохимических превращений, восприятия и передачи сигналов, двигательных процессов таков, что за это время изменения внешнего давления и температуры незначительны, то с достаточной степенью точности биохимические процессы в живых организмах можно рассматривать как изобарно-изотермические. Поэтому в качестве термодинамической характеристики этих процессов можно использовать изменение изобарно-изотермического потенциала или энергии Гиббса ΔG. Интегрально любой процесс в таких системах может идти самопроизвольно только при уменьшении энергии Гиббса. Поэтому все многочисленные биохимические превращения, идущие с ее увеличением (эндэргонические), должны протекать сопряженно с процессами, сопровождающимися уменьшением энергии Гиббса (экзэргоническими), причем суммарный итог должен характеризоваться значением $\Delta G < 0$.

Количественной термодинамической характеристикой химического процесса является величина ΔG^0, представляющая собой изменение энергии Гиббса при протекании реакции при стандартных концентрациях компонентов — исходных веществ и продуктов реакции. Обычно в качестве таковых для растворителя принимают активность, равную единице, а для всех остальных компонентов — концентрации 1М. Следует при этом иметь в виду, что сама по себе величина ΔG^0 еще не характеризует направление процесса, которое определяется знаком величины ΔG, связанной с ΔG^0 соотношением

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \Pi. \qquad (8.1)$$

Здесь Π — так называемое произведение реакции, равное отношению произведения концентраций (активностей) всех продуктов реакции в степенях, равных стехиометрическим коэффициентам этих продуктов в уравнении процесса, к такому же произведению для исходных веществ. Например, для реакции гидролиза АТФ (PPP—Ado) до АДФ (PP—Ado) и ортофосфата в разбавленном водном растворе, принимая активность воды равной единице, можно записать

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[\text{PP} - \text{Ado}]\,[\text{H}_2\text{PO}_4]}{[\text{PPP} - \text{Ado}]}. \qquad (8.2)$$

Однако, как видно из приведенного примера, стоящая под знаком логарифма величина является функцией активности ионов водорода, т.е. pH раствора, пос-

кольку в биологически значимых условиях, т.е. в области значений pH, близких к 7, все три компонента находятся в частично ионизованном состоянии и доля неионизованных форм, входящих в выражение (8.2), невелика. Более того, эта доля по-разному изменяется для каждого из компонентов при изменении pH.

Масштаб вклада изменений pH в величину ΔG можно наглядно продемонстрировать на примере реакции окисления этанола, описываемой уравнением

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NAD\cdot H + H^+ \qquad \text{(VIII.1)}$$

Слагаемое $RT\ln[H^+]$ при pH 7 составляет $-5{,}7\cdot 7 = -40$ кДж/моль. Это довольно значительная величина, как будет видно из значений стандартных изменений энергии Гиббса для процессов, имеющих значение в биоэнергетике. Поэтому, чтобы иметь дело со значениями, более адекватно отражающими преимущественное направление того или иного процесса в биологически значимых условиях, в биохимии принято пользоваться величинами $\Delta G^{0\prime}$, которые соответствуют стандартному состоянию с концентрацией всех растворенных веществ 1М, а ионов водорода — 10^{-7}М. С использованием этой величины выражение (8.1) для реакции окисления этанола запишется при pH 7 в виде

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + RT\ln\frac{[CH_3CHO][NAD\cdot H]}{[CH_3CH_2OH][NAD^+]}, \qquad (8.3)$$

а при произвольном значении pH — в виде

$$\Delta G = \Delta G^{0\prime} + RT\ln\frac{[CH_3CHO][NAD\cdot H][H^+]10^7}{[CH_3CH_2OH][NAD^+]}. \qquad (8.4)$$

Наглядное представление о различии величин ΔG^0 и $\Delta G^{0\prime}$ дает сравнение их значений для реакции

$$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$$

Из физической химии хорошо известно, что все значения ΔG^0 для реакций с участием заряженных частиц носят относительный характер и, чтобы приписать им абсолютное значение, принимается, что ΔG^0 для окисления водорода равно нулю. В то же время для окисления водорода при pH 7 при стандартном значении парциального давления H_2 и активности иона водорода 10^{-7} М

$$\Delta G^{0\prime} = \Delta G^0 + RT\ln\{[H^+]^2/p_{H_2}\} = -79{,}8 \text{ кДж/моль}. \qquad (8.5)$$

Значение $\Delta G^{0\prime}$ дает достаточно хорошее представление о направлении биохимического процесса в нейтральной среде, если соотношения компонентов незначительно отличаются от стехиометрических и если процесс без учета ионов H^+ молекул воды идет без изменения числа частиц.

Например, для реакции изомеризации глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат $\Delta G^{0\prime} = 1{,}7$ кДж/моль и в соответствии с этим при 25°С (298 К)

$$K = \exp[-\Delta G^{0\prime}/(RT)] = 0{,}5. \qquad (8.6)$$

Следовательно, в равновесной смеси концентрация глюкозо-6-фосфата примерно в два раза превышает концентрацию фруктозо-6-фосфата. Для реакции фосфорилирования глюкозы, протекающей по реакции

$$Glc + PPP - Ado \rightleftharpoons Glc - 6P + PP - Ado, \qquad \text{(VIII.2)}$$

$\Delta G^{0\prime} = -16{,}7$ кДж/моль и, следовательно, $K = 850$. Это означает, что в стехиометрической смеси при pH 7 отношение концентраций продуктов к концентрациям исходных веществ в равновесии составит $\sqrt{K} = 29$, т.е. реакция пройдет в сторону образования глюкозо-6-фосфата с выходом более чем 95%.

Если число частиц в реакции возрастает, то уменьшение абсолютных значений концентраций компонентов будет способствовать смещению равновесия в сторону продуктов реакции. Например, реакция превращения фруктозо-1,6-дифосфата в смесь глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата характеризуется довольно высоким положительным значением величины $\Delta G^{0\prime} = 23{,}8$ кДж/моль. Однако при концентрациях компонентов 10^{-4} М в стехиометрической смеси всех трех компонентов ΔG составит

$$\Delta G = +23{,}8 + RT\ln(10^{-4}) = 23{,}8 - 22{,}8 = 1 \text{ кДж/моль}, \qquad (8.7)$$

т.е. близко к нулю. В равновесной смеси при этом будут присутствовать соизмеримые количества исходного вещества и продуктов реакции.

Большое число важных для биоэнергетики процессов являются окислительно-восстановительными. Для таких процессов наряду со значением ΔG^0 можно использовать величину ΔE^0 — стандартную разность *окислительно-восстановительных потенциалов* для двух сопряженных пар окислитель—восстановитель, участвующих в превращении. Связь между этими величинами имеет вид

$$\Delta E^0 = \Delta G^0/(nF), \qquad (8.8)$$

где n — число электронов, переносимых от восстановителя к окислителю; F — постоянная Фарадея.

Удобство такого представления прежде всего состоит в том, что появляется возможность характеризовать относительные окислительные, а следовательно, и восстановительные свойства каждой сопряженной пары и тем самым расположить их в определенный ряд в порядке убывания потенциала E^0. Величина ΔE^0 для любого процесса получается в виде разности величин E^0 для каждой из двух участвующих в процессе пар.

Так же как и для значений ΔG^0, в биохимии принято пользоваться величинами E^0, полученными для стандартного состояния, соответствующего pH 7.

8.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ

Развитие жизни на Земле пошло по пути использования в качестве главного экзэргонического процесса, обеспечивающего биоэнергетические потребности живых организмов, практически универсального для всей живой природы химического превращения гидролиза одной из пирофосфатных связей в молекулах аденозин-5′-трифосфата (АТФ) или, реже, гуанозин-5′-трифосфата (ГТФ).

Уже на примерах, приведенных в предыдущих разделах курса, видно, сколь многопланово используется гидролиз АТФ и ГТФ для обеспечения энергетических потребностей процессов жизнедеятельности. Это прежде всего синтез различных соединений, в том числе биополимеров. Гидролиз АТФ до АМФ и пирофосфата, сопряженный с аминоацилированием транспортных РНК, покрывает минимальные энергетические затраты при биосинтезе белков (см. § 4.6 и 5.6). Фосфорилирование нуклеозид-5′-фосфатов до соответствующих ди- и трифосфатов, которое происходит с участием двух молекул АТФ в качестве доноров фосфата,

сопровождается исчезновением двух пирофосфатных связей в молекулах АТФ в расчете на каждую молекулу исходного нуклеотида, но при этом обеспечивает энергетику биосинтеза нуклеиновых кислот (см. § 5.4 и 5.5). Гидролиз АТФ до АДФ и ортофосфата способствует направленному перемещению ДНК-геликаз в вилке репликации и направленной перестановке нитей ДНК при создании отрицательных супервитков в ходе функционирования топоизомеразы II (см. § 5.4). Гидролиз ГТФ до ГДФ и ортофосфата является необходимым условием эффективной транслокации мРНК и пептидил-тРНК в синтезе пептидов на рибосомах (см. § 5.6). Гидролиз АТФ Na^+, K^+-зависимой АТФазой обеспечивает создание градиента концентраций ионов натрия и калия между содержимым клетки и окружающей средой, необходимого для возникновения потенциала покоя и, в случае передачи возбуждения, в синапсе — для возникновения потенциала действия и его перемещения вдоль нервного волокна (см. § 2.1). В высокоорганизованной системе, каковой является мышечное волокно, тот же гидролиз АТФ до АДФ и ортофосфата является источником энергии для синхронного перемещения нитей белка актина, находящегося в комплексе с другим мышечным белком, миозином, что приводит к мышечному сокращению и совершению механической работы. Много других примеров, особенно касающихся энергетического обеспечения многочисленных эндэргонических биохимических процессов, будет приведено в последующих главах курса.

В связи с этим глобальной задачей биоэнергетики живых организмов является регенерация АТФ из АДФ и АМФ. В живой природе эта регенерация происходит как фосфорилирование АДФ, а АМФ предварительно превращается в АДФ по реакции

$$P - Ado + PPP - Ado \rightleftharpoons 2PP - Ado \qquad (VIII.3)$$

катализируемой ферментом аденилаткиназой. Фосфорилирование АДФ является, естественно, эндэргоническим процессом и требует привлечения специальных источников энергии. Среди них в живой природе резко доминируют два.

Один из них — это солнечная энергия, усваиваемая зелеными растениями и некоторыми микроорганизмами в процессе фотосинтеза. В ходе фотосинтеза энергия поглощенных квантов света используется для осуществления высокоэндэргонического процесса переноса электронов от молекул воды на $NADP^+$ по суммарному уравнению

$$NADP^+ + H_2O \rightarrow {}^1/_2O_2 + NADP\cdot H + H^+ \qquad (VIII.4)$$

Частично эта энергия расходуется на фосфорилирование АДФ. Отдельные стадии этого сложного процесса называют *световыми стадиями фотосинтеза*. Накопление в хлоропластах $NADP\cdot H$ и АТФ создает необходимые предпосылки для восстановления CO_2, которое происходит уже без участия световой энергии и приводит к накоплению углеводов по брутто-уравнению

$$6CO_2 + 12NADPH + 12H^+ + 18PPP - Ado \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 12NADP^+ + 6H_2O + 18PP - Ado + 18Pi \qquad (VIII.5)$$

Стадии этого процесса называют *темновыми стадиями фотосинтеза*.

Второй источник, используемый большинством микроорганизмов и всеми животными, — энергия окисления органических соединений, поступающих к ним в качестве пищи.

Органические соединения, окисление которых служит источником энергии, т.е. приводит в конечном итоге к фосфорилированию АДФ, весьма многообразны. Однако доминирующее место среди них имеет окисление углеводов, в первую очередь глюкозы. Окислительная деструкция глюкозы отчетливо разбивается на три группы реакций. В первой группе реакций глюкоза превращается в отсутствие O_2 в молочную кислоту или этанол, а в присутствии O_2 — в пируват и далее в связанный с коферментом А ацетильный остаток. Этот процесс называют гликолизом и детально рассматривают в § 8.2. К сходному результату приводит вторая группа реакций — деструкция жирных кислот, итогом которой также является превращение углеродного скелета жирной кислоты в соответствующее число ацетильных остатков в виде $CoA\text{-}SCOCH_3$ (подробнее см. § 8.3). Следующим, общим для окисления как углеводов, так и жирных кислот является окисление связанного с коферментом А ацетильного остатка до CO_2 и воды. Это окисление происходит в так называемом цикле трикарбоновых кислот (см. § 8.4). В основном (хотя не исключительно) окислителем в этих процессах является NAD^+, который при этом превращается в $NAD\cdot H$. Именно накопление восстановленной формы этого никотинамидного кофермента приводит далее к основному биоэнергетическому итогу окислительного фосфорилирования — превращению трех молекул АДФ в три молекулы АТФ при переносе каждой пары электронов от $NAD\cdot H$ к O_2 по брутто-уравнению

$$NAD\cdot H + {}^1/_2O_2 + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2O \qquad (VIII.6)$$

Этот процесс происходит в сложно организованной системе, называемой цепью переноса электронов, которая вкратце описывается в § 8.5.

Единственной стадией, имеющей важное биоэнергетическое значение, при окислительной деструкции углеводов и жирных кислот, в которой не участвуют никотинамидные коферменты, является окисление фрагмента $-CH_2-CH_2-$ до $-CH=CH-$. Это превращение происходит путем переноса электронов на производное бензохинона, известное под названием кофермента Q(CoQ), структура которого приведена в § 8.5. Эти процессы, общая схема которых может быть записана в виде

$$-CH_2-CH_2- + CoQ \longrightarrow -CH=CH- + CoQH_2 \text{ (восстановленный кофермент Q)},$$

поставляют восстановленный кофермент Q в цепь переноса электрона, где он окисляется с одновременным фосфорилированием двух молекул АДФ.

Значение АТФ как универсального аккумулятора энергии заключается в том, что гидролиз любой из двух пирофосфатных связей АТФ в виде магниевой соли характеризуется значительным по абсолютной величине уменьшением стандартной свободной энергии: −31,0 кДж/моль при превращении АТФ в АДФ и −31,8 кДж/моль при превращении в АМФ. Так как реальные концентрации АТФ в условиях живого организма существенно ниже стандартной, а гидролиз сопровождается увеличением числа молекул (образование воды на величину ΔG практически не влияет, так как в величину Π в (8.1) входит ее активность, близкая к 1), то ΔG для гидролиза АТФ по абсолютной величине будет существенно выше приведенных значений ΔG^0.

Процессы гидролиза, типичные для живой природы, как правило, характеризуются значениями $\Delta G^{0\prime} < 0$. Это касается гидролиза сложных эфиров карбоновых и фосфорной кислот, амидов карбоновых кислот, тиоэфиров, смешанных и симметричных ангидридов карбоновых кислот, фосфорилгуанидиновых произ-

Таблица 8.1. Свободная энергия гидролиза некоторых соединений

Соединение	$\Delta G^{\circ\prime}$, кДж/моль	Соединение	$\Delta G^{\circ\prime}$, кДж/моль
Фосфоенолпируват	–61,92	Ацетил-CoA	–31,38
Карбамоилфосфат	–51,46	АТФ (до АМФ)	–31,8
Ацетилфосфат	–43,10	АТФ (до АДФ)	–31,0
Креатинфосфат	–37,66	Диэфиры фосфорной кислоты	–25,10
Сукцинил-CoA	–33,47	Глюкозо-6-фосфат	–13,81

водных. Типичные значения для гидролиза представителей этих групп соединений приведены в табл. 8.1. Некоторые из этих процессов характеризуются значениями $\Delta G^{0\prime}$, существенно более низкими по абсолютной величине, чем $\Delta G^{0\prime}$ для гидролиза АТФ. К ним относятся сложные эфиры и амиды карбоновых кислот, фосфомоно- и фосфодиэфиры. По этой причине моноэфиры фосфорной кислоты не могут служить донорами фосфата в реакции фосфорилирования АДФ. Процессы фосфорилирования спиртовых групп с участием АТФ, например реакция (VIII.12) фосфорилирования глюкозы, с точки зрения ее биохимической значимости является необратимой и для регенерации АТФ из АДФ живыми организмами не используется. В то же время, как видно из той же таблицы, имеется группа соединений, для которых $\Delta G^{0\prime}$ гидролиза имеет тот же порядок, что и для АТФ, а в некоторых случаях превосходит эту величину. К этой группе соединений относятся ангидриды, тиоэфиры и некоторые отдельные соединения с другой структурой гидролизуемой группы — *фосфоенолпируват* (116) и *креатинфосфат* (117). Эти соединения, наоборот, нередко принимают участие в регенерации АТФ и ГТФ из соответствующих дифосфатов. Примерами могут служить реакции

$$^{2-}O_3POCH_2—CHOH—COO—PO_3^{2-} + PP—Ado \longrightarrow$$
1,3-дифосфоглицерат

$$\longrightarrow O_3POCH_2CHOCOO^- + PPP—Ado \qquad \text{(VIII.7)}$$
3-фосфоглицерат

$$CH_2{=}C(OPO_3^{2-})—COO^- + PP—Ado \longrightarrow CH_3COCOO^- + PPP—Ado \qquad \text{(VIII.8)}$$
фосфоенолпируват — пируват

116

$$^-OOCH_2CH_2CO—SCoA + HPO_4^{2-} + PP—Guo \longrightarrow PPP—Guo + {}^-OOCCH_2CH_2COO^- + CoA—SH$$
сукцинилкофермент А

(VIII.9)

$$^{2-}O_3PHN—C(=NH)—N(CH_3)—CH_2COO^- + PP—Ado \longrightarrow H_2N—C(=NH)—N(CH_3)—CH_2COO^- + PPP—Ado$$

(VIII.10)

117

Таблица 8.2. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы $E^{0\prime}$ некоторых сопряженных пар окислитель–восстановитель

Сопряженная пара окислитель-восстановитель	Тип окислительного процесса	$E^{0\prime}$, В
$0{,}5\ O_2/H_2O$		0,82
Цитохром *c* (+3)/цитохром *c*(+2)		0,22
$CoQ/CoQH_2$		0,10
$NAD^+/NADH$		–0,32
$FAD/FADH_2$		–0,12
$^-OOCCH_2CH_2COO^-/^-OOCCH{=}CHCOO^-$	Дегидрирование —CH_2—CH_2-групп	0,03
Кротонил-CoA/Бутирил-CoA	То же	0,19
CH_3CHO/CH_3CH_2OH	Окисление OH-группы	–0,20
H^+/H_2		–0,42
$CH_3COCOO^-/CH_3CHOHCOO^-$	То же	–0,19
$CH_3CHO + CO_2/CH_3COCOO^-$	Окислительное декарбоксилирование α-кетокислот	–0,70
$^-OOCCH_2CH_2COO^- + CO_2/^-OOCCH_2CH_2COCOO^-$	То же	–0,67
CH_3COO^-/CH_3CHO	Окисление альдегидов	–0,60

Реакции (VIII.7) и (VIII.8) являются важнейшими источниками АТФ при анаэробном превращении глюкозы (§ 8.2).

Химические связи, гидролиз которых характеризуется значениями $\Delta G^{0\prime}$ порядка –30 кДж/моль и выше (по абсолютному значению), в биохимии часто называют *макроэргическими связями*. Естественно, что к их числу относят и пирофосфатные группы в нуклеозидтрифосфатах, в том числе и АТФ. Сами соединения, обладающие такими связями, называют макроэргами.

Из структуры приведенных в табл. 8.1 макроэргов нетрудно видеть, что это в основном ангидриды фосфорной и карбоновых кислот, а также слабых кислот, каковыми являются тиолы и енолы. В последнем случае для главного представителя таких производных, фосфоенолпирувата, наблюдается особенно высокое по модулю значение $\Delta G^{0\prime}$. Это связано не только с наличием у енола слабокислых свойств, но и с тем, что образующийся при гидролизе енолпируват термодинамически неустойчив и с существенным дополнительным уменьшением энергии Гиббса изомеризуется в пируват.

Поскольку, как сказано выше, многие биоэнергетические процессы являются окислительно-восстановительными, в табл. 8.2 для некоторых из них приведены значения окислительно-восстановительных потенциалов $E^{0\prime}$.

8.2. ГЛИКОЛИЗ

Гликолиз является первым, а в анаэробных условиях основным этапом на пути использования глюкозы и других углеводов для обеспечения биоэнергетических потребностей живых организмов. Кроме того, на промежуточных стадиях глико-

лиза образуются трехуглеродные фрагменты, используемые для биосинтеза ряда веществ.

Стержневым этапом гликолиза является окислительная деструкция глюкозы до двух молекул пирувата — соли пировиноградной кислоты с использованием в качестве окислителя двух молекул NAD^+. Стехиометрическое уравнение процесса записывается в виде

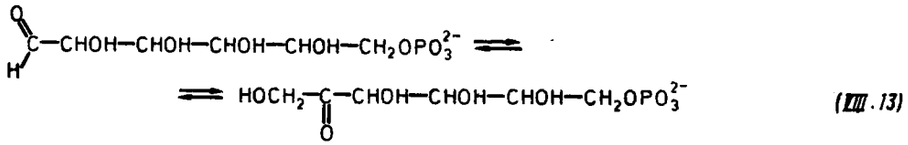
$$C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ \longrightarrow 2CH_3COCOO^- + 4H^+ + 2NAD\cdot H \qquad (VIII.11)$$

Практически все основные стадии этого процесса уже описаны в первую очередь при рассмотрении различных классов ферментов. Ниже эти процессы и катализирующие их ферменты приводятся в порядке их протекания, исходя из глюкозы.

1. Превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат, катализируемое *гексокиназой*:

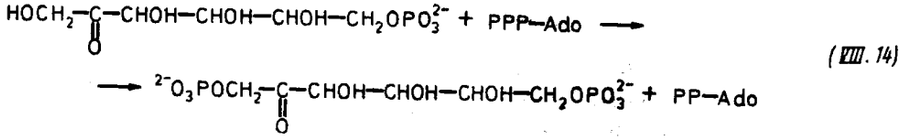
$$Glc + PPP{-}Ado \longrightarrow Glc{-}6P + PP{-}Ado \qquad (VIII.12)$$

2. Изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, катализируемая глюкозо-6-фосфат изомеразой:



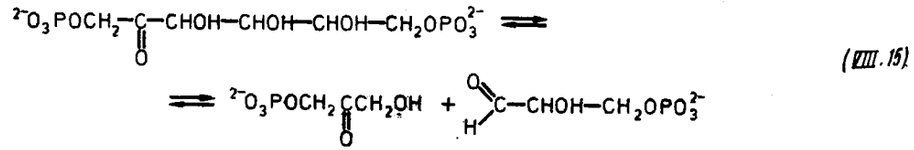
(VIII.13)

3. Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-дифосфата, катализируемое 6-фосфофруктокиназой:



(VIII.14)

4. Распад фруктозо-1,6-дифосфата на глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, катализируемый фруктозодифосфат альдолазой:



(VIII.15)

5. Изомеризация дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат, катализируемая *триозофосфат изомеразой*:



(VIII.16)

Если последующие стадии гликолиза протекают в аэробных условиях, то $NAD\cdot H$, образующийся в ходе окислительного превращения глюкозы, должен быть окислен. Поскольку запасы NAD^+ в клетке ограничены, то $NAD\cdot H$ должен быть регенерирован в NAD^+. Это происходит при восстановлении пирувата до молочной кислоты, катализируемом *лактатдегидрогеназой*:

$$CH_3COCOO^- + NAD\cdot H + H^+ \rightleftharpoons CH_3CHOHCOO^- + NAD^+ \qquad (VIII.17)$$

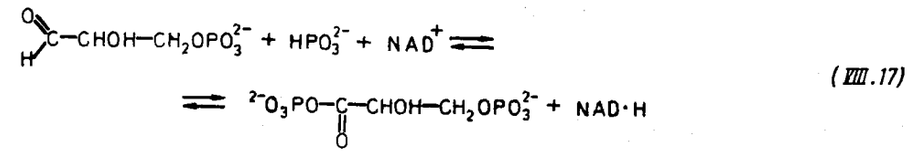
Однако в аэробных условиях $NAD\cdot H$ окисляется в дыхательной цепи, сопряженной с синтезом АТФ, и образование молочной кислоты не происходит. Поэтому в аэробных условиях гликолиз является источником АТФ.

Гликолиз в анаэробных условиях является единственным источником АТФ для эритроцитов, лишенных митохондрий, и для мышц при интенсивной работе, когда потребность в АТФ превышает возможности его синтеза в дыхательной цепи.

Гликолиз является основным источником АТФ для опухолевых клеток, которые характеризуются высокой скоростью роста и, соответственно, высокой потребностью в АТФ. Поэтому ингибиторы гликолиза могут использоваться в качестве противоопухолевых средств.

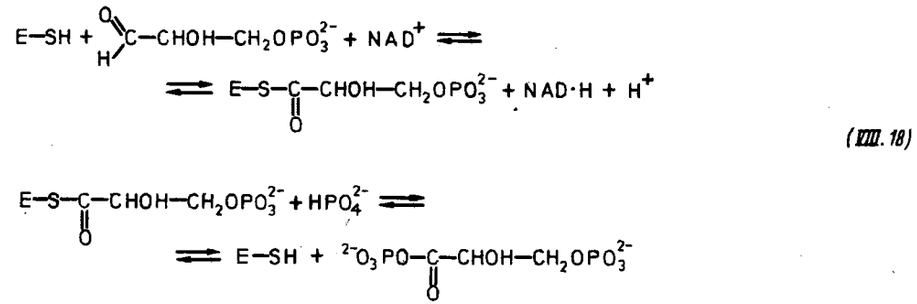
Рассмотрим подробно стадии гликолиза, начиная с образования глицеральдегид-3-фосфата.

6. Окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-дифосфоглицерата, катализируемое *глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой*:



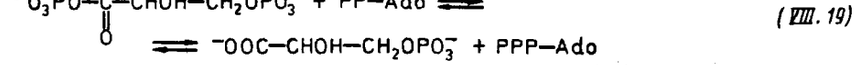
(VIII.17)

Процесс происходит через промежуточное образование тиоэфира между окисляемой альдегидной группой и SH-группой остатка цистеина, входящего в активный центр фермента. Эта связь затем подвергается фосфоролизу неорганическим фосфатом с регенерацией активного центра и образованием смешанного ангидрида 3-фосфоглицериновой и фосфорной кислот:



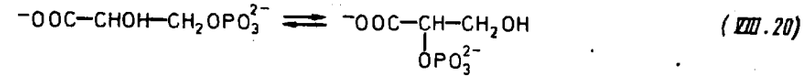
(VIII.18)

7. Перенос фосфата с 1,3-дифосфоглицерата на АДФ с образованием молекулы АТФ, катализируемый фосфоглицерат киназой (название дано в соответствии с обратной реакцией):



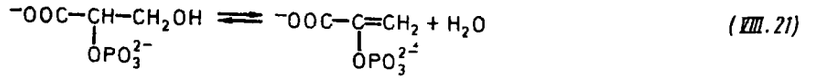
(VIII.19)

8. Изомеризация 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат, катализируемая фосфоглицерат мутазой:



(VIII.20)

9. Дегидратация 2-фосфоглицерата, катализируемая *енолазой* и приводящая к образованию сильного макроэрга — фосфоенолпирувата:



(VIII.21)

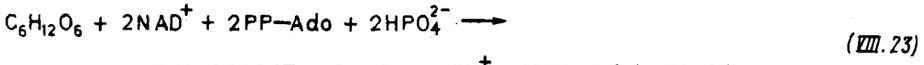
10. Перенос фосфата от фосфоенолпирувата на АДФ с образованием еще одной молекулы АТФ, катализируемый *пируват киназой* (название дано в соответствии с обратной реакцией):



(VIII.22)

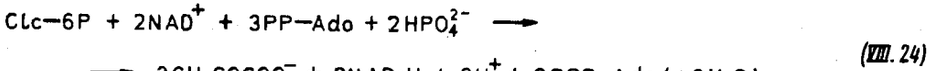
В табл. 8.3 даны термодинамические характеристики всех перечисленных стадий гликолиза. В виде схемы процесс представлен на рис. 99.

Прежде чем просуммировать эти уравнения, следует обратить внимание на то обстоятельство, что на первых стадиях гликолиза расходуется две макроэргические связи в молекулах АТФ для превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат. На последующих стадиях в расчете на одну исходную молекулу глюкозы две молекулы АДФ фосфорилируются в реакции (VIII.19) и две в реакции (VIII. 18). Таким образом, итогом является превращение двух молекул АДФ и двух молекул ортофосфата в две молекулы АТФ. С учетом этого суммарное уравнение следует записать в виде



(VIII.23)

Если вести отсчет от глюкозо-6-фосфата, то уравнение примет вид



(VIII.24)

Дальнейшие события развиваются в одном из трех направлений. В аэробных условиях происходит окислительное декарбоксилирование пирувата в соответствии со схемой, описанной в § 4.1 для окислительного декарбоксилирования α-кетокислот. В данном случае оно протекает в комплексе из трех ферментов, называемом пируватдегидрогеназным комплексом. Итогом этого процесса является

Таблица 8.3. Термодинамические характеристики стадий гликолиза

№ п/п	Реакция	$\Delta G^{0\prime}$, 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_2O	+1,67
10	Фосфоенолпируват + АДФ + H^+ → Пируват + АТФ	−31,38

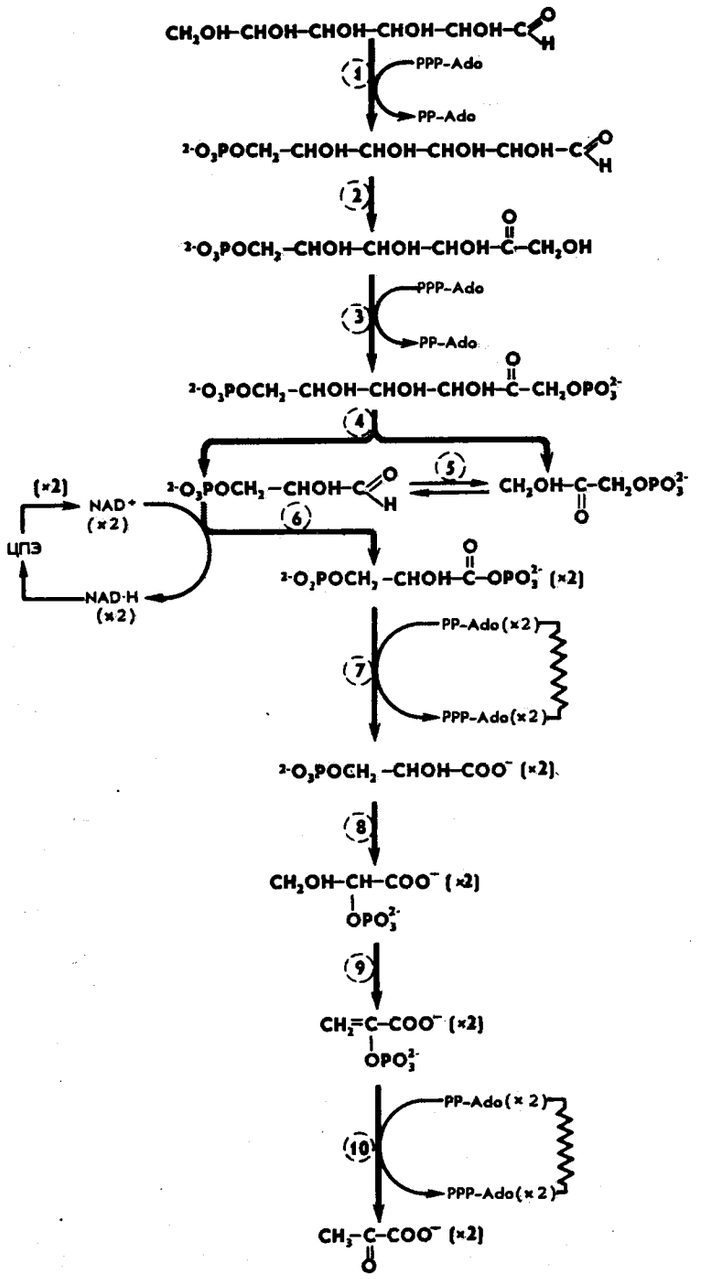


Рис. 99. Схема гликолиза (превращение глюкозы в две молекулы пирувата)

Номера соответствуют стадиям, приведенным в тексте, ЦПЭ – цепь переноса электронов. Зигзагом обозначена вся сумма многочисленных превращений, использующих макроэргическую связь АТФ; (×2) – отмечены молекулы, представленные дважды в расчете на одну молекулу глюкозы

декарбоксилирование пирувата и связывание ацетильного остатка с коферментом А:

$$CoA\text{–}SH + CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}COO^- + NAD^+ \longrightarrow CoA\text{–}SCOCH_3 + CO_2 + NAD\cdot H \qquad (VIII.25)$$

Отдельные стадии этого процесса описаны в § 4.1 и 4.2.

В анаэробных условиях для развития процесса необходима регенерация NAD^+. Это происходит двумя путями. Один из них — восстановление накапливающимся $NAD\cdot H$ самого пирувата с помощью фермента *лактат дегидрогеназы*, катализирующей реакцию

$$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}COO^- + NAD\cdot H \overset{(+H^+)}{\rightleftharpoons} CH_3CHOHCOO^- + NAD^+ \qquad (VIII.26)$$

Второй путь — декарбоксилирование пирувата с образованием CO_2 и ацетальдегида и восстановление последнего до этанола, катализируемые соответственно пируватдекарбоксилазой и алкогольдегидрогеназой:

$$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}COO^- \xrightarrow{(+H^+)} CH_3CHO + CO_2 \qquad (VIII.27)$$

$$CH_3CHO + NAD\cdot H + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+ \qquad (VIII.28)$$

Эти процессы называют соответственно *молочнокислым* и *спиртовым брожением*. Оба они широко используются в пищевой промышленности. Молочнокислое брожение осуществляется различными молочнокислыми бактериями, спиртовое брожение — дрожжами.

Молочнокислое и спиртовое брожение — основные источники обеспечения энергией указанных микроорганизмов в анаэробных условиях. Из приведенной схемы следует, что на каждую молекулу глюкозы, превращенную в две молекулы молочной кислоты или этанола, фосфорилируется две молекулы АТФ. Таким образом, биоэнергетическим итогом анаэробного гликолиза является образование двух макроэргических связей на одну деградированную молекулу глюкозы.

В аэробных условиях, когда регенерация NAD^+ происходит в результате окисления $NAD\cdot H$ кислородом в цепи переноса электронов, к этому скромному итогу сразу добавляется еще шесть молекул АТФ, образующихся в результате окислительного фосфорилирования двух молекул $NAD\cdot H$. Столько же молекул АТФ образуется в результате появления еще двух молекул $NAD\cdot H$ при функционировании пируватдегидрогеназного комплекса. С учетом сопутствующего фосфорилирования АДФ стехиометрические уравнения для трех вариантов гликолиза можно записать в виде

$$C_6H_{12}O_6 + 2PP\text{–}Ado + 2HPO_4^{2-} \longrightarrow \underset{\text{молочнокислое брожение}}{2CH_3CHOHCOOH} + 2PPP\text{–}Ado \qquad (VIII.29)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2PP\text{–}Ado + 2HPO_4^{2-} \longrightarrow \underset{\text{спиртовое брожение}}{2CH_3CH_2OH + 2CO_2} + 2PPP\text{–}Ado \qquad (VIII.30)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 4NAD^+ + 2CoA\text{–}SH + 2HPO_4^{2-} + 2PP\text{–}Ado \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \underset{\text{аэробный гликолиз}}{2CoA\text{–}SCOCH_3 + 2CO_2} + 4NAD\cdot H + 2PPP\text{–}Ado \qquad (VIII.3$$

Из последнего уравнения следует, что с учетом АТФ, образующегося при окислении $NAD\cdot H$ в цепи переноса электронов, превращение молекулы глюкозы в два ацетильных фрагмента, связанных с коферментом А, обеспечивает образование 14 молекул АТФ.

Если гликолиз начинается не с глюкозы, а с гликогена или крахмала, то первой стадией процесса является фосфоролиз полисахарида с образованием глюкозо-1-фосфата (см. § 4.2), за которым следует изомеризация, приводящая к образованию глюкозо-6-фосфата (см. § 4.5). После этого включается вся последующая цепочка превращений. При этом на введение в гексозу первого остатка фосфорной кислоты АТФ не расходуется. Следовательно в этом случае биоэнергетический итог анаэробного процесса составит три молекулы АТФ, а аэробного — 15.

8.3. ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Наряду с окислением углеводов важным биоэнергетическим процессом является окисление жирных кислот. Остатки жирных кислот длиной до 18 углеродных атомов входят в состав жиров, которые являются важным энергетическим резервом живых организмов, и в состав важнейших фосфолипидов, из которых построены многочисленные мембраны. Жирные кислоты образуются при гидролизе сложноэфирных связей этих соединений внутриклеточными липазами и фосфолипазами или аналогичными ферментами в пищеварительном тракте высших организмов. У эукариот окисление жирных кислот происходит преимущественно в митохондриальном матриксе.

Все стадии окислительной деструкции жирных кислот протекают с ацильными остатками, связанными тиоэфирной связью с коферментом А. Этим процессам предшествует образование ацилкофермента А из жирной кислоты и кофермента А, происходящее сопряженно с расщеплением АТФ до АМФ и неорганического пирофосфата, и катализуемое ацил-CoA синтетазой (тиокиназой жирных кислот):

$$CoA\text{–}SH + CH_3(CH_2\text{–}CH_2)_xCOO^- + PPP\text{–}Ado \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons CoA\text{–}SCO(CH_2\text{–}CH_2)_xCH_3 + PP_i + P\text{–}Ado \qquad (VIII.32)$$

Из цитоплазмы в митохондриальный матрикс жирные кислоты и ацилкофермент А непосредственно не проникают и предварительно превращаются в соответствующие ацильные производные (119) *карнитина* (118) по реакции, катализируемой *карнитин: ацил-CoA-трансферазой* (для длинных цепей):

$$CoA\text{–}SCO(CH_2\text{–}CH_2)_xCH_3 + (CH_3)_3\overset{+}{N}\text{–}CH_2\underset{\underset{OH}{|}}{CH}CH_2COO^- \rightleftharpoons$$

118

$$\rightleftharpoons CoA\text{–}SH + (CH_3)_3\overset{+}{N}\text{–}CH_2\underset{\underset{OCO(CH_2\text{–}CH_2)_xCH_3}{|}}{CH}CH_2COO^- \qquad (VIII.33)$$

119

С помощью такого же фермента в матриксе после пересечения ацилкарнитином внутренней митохондриальной мембраны происходит обратный перенос ациль-

ного остатка на кофермент А и начинается цепочка превращений, приводящая к ступенчатой деградации углеводородной цепи. Каждый цикл такой деградации приводит к укорочению цепи на два углеродных атома и состоит из следующих стадий:

1. Дегидрирование α,β-метиленовых групп с помощью фермента ацил-CoA дегидрогеназы. Фермент представляет собой флавопротеид, который, получив электроны (атомы H) от ацильного остатка, передает их с помощью промежуточного переносчика, также флавопротеида (см. § 8.5), на кофермент Q, т.е. в цепь переноса электронов. Поэтому суммарное уравнение реакции, катализируемой *ацилкофермент А дегидрогеназой*, имеет вид

$$CoA{-}SCO{-}CH_2{-}CH_2{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + CoQ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CoA{-}SCO{-}CH{=}CH{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + CoQH_2 \qquad (VIII.34)$$

В митохондриях имеется всего три ацилкофермент А дегидрогеназы, специфичные к ацильным остаткам разной длины — коротким (4—6 атомов C), средним (8—12 атомов C) и длинным (8—18 атомов C). Поскольку с кофермента Q электроны переносятся на кислород через комплексы III и IV, то биоэнергетическим итогом одного акта дегидрирования α,β-метиленовых групп является фосфорилирование двух молекул АДФ с образованием двух молекул АТФ.

2. Гидратация двойной связи, образовавшейся на предыдущей стадии, которая катализируется *еноил-CoA гидратазой*:

$$CoA{-}SCO{-}CH{=}CH{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + H_2O \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons CoA{-}SCOCH_2{-}CHOH{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 \qquad (VIII.35)$$

3. Окисление гидроксигруппы до кетогруппы с помощью NAD^+, катализируемое *3-гидроксиацил-CoA дегидрогеназой*:

$$CoA{-}SCOCH_2{-}CHOH{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + NAD^+ \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons CoA{-}SCOCH_2{-}CO{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + NAD{\cdot}H + H^+ \qquad (VIII.36)$$

4. Перенос фрагмента $CO{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3$ на SH-группу новой молекулы кофермента А, катализируемый *3-кетоацил-CoA тиолазой*:

$$CoASH + CoA{-}SCOCH_2{-}CO{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CoASCOCH_3 + CoA{-}SCO(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 \qquad (VIII.37)$$

Схема окисления двууглеродного фрагмента CH_2CH_2 до связанного с коферментом А фрагмента $COCH_3$ представлена на рис. 100.

Суммарное стехиометрическое уравнение для процессов (VIII.34) — (VIII.37) записывается в виде

$$CoA{-}SCO{-}CH_2{-}CH_2{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + CoA{-}SH + CoQ + NAD^+ + H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CoA{-}SCO{-}(CH_2{-}CH_2)_{x-1}CH_3 + CoA{-}SCOCH_3 + CoQH_2 + NAD{\cdot}H + H^+ \qquad (VIII.38)$$

Образовавшаяся молекула ацилкофермента А с укороченным на два атома углерода ацильным фрагментом вступает в следующий цикл деградации. Процесс

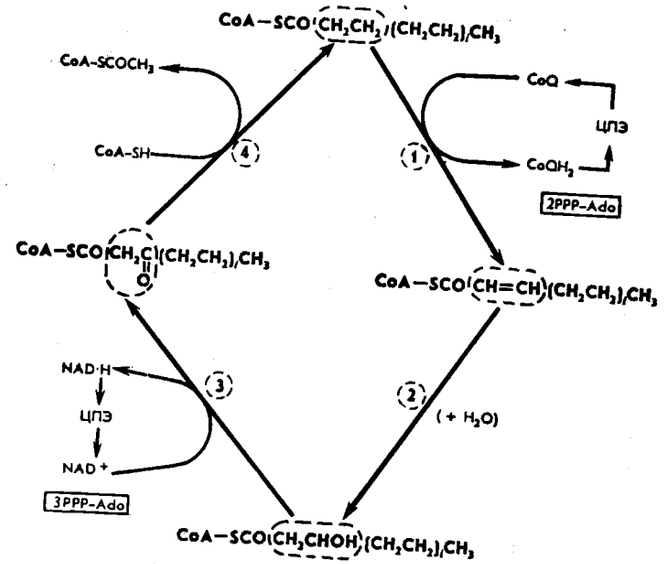


Рис. 100. Схема одного цикла окислительной деструкции CH_2CH_2-группы жирной кислоты

После каждого цикла x уменьшается на единицу. Нумерация стадий соответствует приведенной в тексте. ЦПЭ – цепь переноса электронов. В прямоугольные рамки заключены молекулы АТФ, образующиеся в цепи переноса электронов при окислении $NAD{\cdot}H$ и $CoQH_2$. Входящая в цикл превращения CH_2CH_2-группа и продукт ее превращения – остаток $-COCH_3$, связанный с коферментом А, взяты в овальные рамки

продолжается до тех пор, пока не образуется ацетоацетилкофермент А, при взаимодействии которого с молекулой CoA образуются две молекулы ацетилкофермента А:

$$CoA{-}SCOCH_2COCH_3 + CoA{-}SH \longrightarrow 2CoA{-}SCOCH_3 \qquad (VIII.39)$$

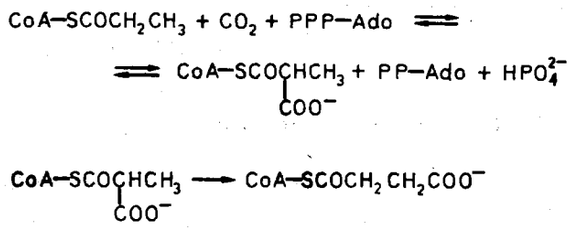
С учетом превращений, претерпеваемых коферментом Q и NAD^+, полное уравнение для окислительной деградации остатка жирной кислоты с четным числом углеродных атомов можно записать в виде

$$CoA{-}SCO(CH_2{-}CH_2)_x CH_3 + xCoA{-}SH + xCoQ + xNAD^+ \longrightarrow$$
$$\longrightarrow (x+1)CoA{-}SCOCH_3 + xCoQH_2 + xNAD{\cdot}H \qquad (VIII.40)$$

Если окисление $CoQH_2$ и $NAD{\cdot}H$ далее осуществляется в цепи переноса электронов и сопровождается окислительным фосфорилированием, то биоэнергетический итог превращения одного ацильного остатка, содержащего $(2x + 2)$ атома C до $(x + 1)$ ацетильного остатка, состоит в образовании $5x$ молекул АТФ. Это еще не полный итог, поскольку дальнейшее сгорание ацетильного остатка ацетилкофермента А до CO_2 и H_2O сопровождается дополнительным запасанием энергии (см. § 8.4).

Если деградации подвергается ацильный остаток, содержащий нечетное число атомов углерода, а также при деградации некоторых аминокислот цепочка процессов завершается образованием пропионил кофермента А. В этом случае происходит превращение

путем присоединения молекулы CO_2, катализируемого *пропионил-CoA карбоксилазой* и далее изомеризация образовавшегося метилмалонилкофермента А в сукцинил-кофермент А при участии фермента метилмалонил-CoA мутазы:



(VIII.41)

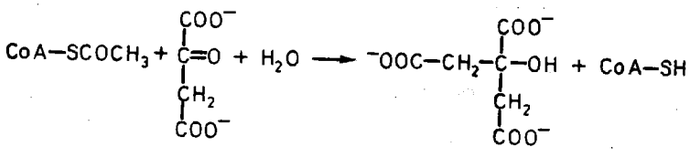
(VIII.42)

Кофактором последнего фермента является витамин B_{12}, содержащий кобальт (см. § 2.6). Образующийся сукцинилкофермент А, как показано ниже, далее деградирует по общей схеме в цикле трикарбоновых кислот.

8.4. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

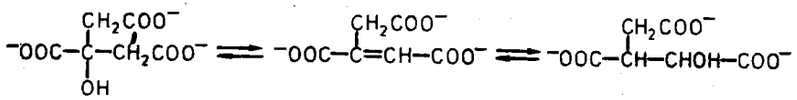
Полное сгорание как жирных кислот, так и углеводов требует окисления до CO_2 и воды ацетильного остатка, связанного с коферментом А. Сгорание происходит в системе реакций, называемых *циклом трикарбоновых кислот* или по имени сформулировавшего его исследователя — *циклом Кребса*. Эта система реакций начинается с присоединения ацетильного остатка ацетилкофермента А к оксалоацетату (соль щавелевоуксусной или кетоянтарной кислоты) с образованием соли трикарбоновой лимонной кислоты — цитрата. Далее цитрат претерпевает ряд последовательных превращений, сопровождающихся двумя актами декарбоксилирования, т.е. выделения CO_2, и в конечном итоге приводящих к регенерации оксалоацетата. Ниже перечислены все стадии цикла трикарбоновых кислот.

1. Взаимодействие ацетилкофермента А с оксалоацетатом, катализируемое ферментом цитратсинтазой, заключающееся в присоединении атома С метильной группы ацетильного остатка к карбонильному углероду оксалоацетата и одновременном гидролизе тиоэфирной связи:



(VIII.43)

2. Изомеризация цитрата в изоцитрат, катализируемая ферментом аконитазой и проходящая через промежуточное образование аконитата путем дегидратации цитрата и последующей гидратации аконитата с превращением его в изоцитрат:

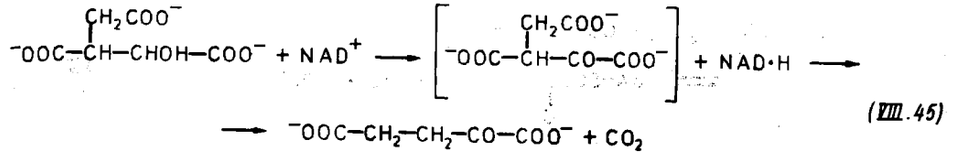


цитрат аконитат изоцитрат

(VIII.44)

3. Окисление гидроксигруппы изоцитрата до карбонильной группы с по-

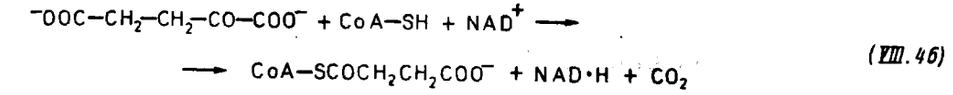
мощью NAD^+, сопровождающееся элиминацией карбоксильной группы в β-положении к образовавшейся кетогруппе, катализируемое *изоцитратдегидрогеназой*:



(VIII.45)

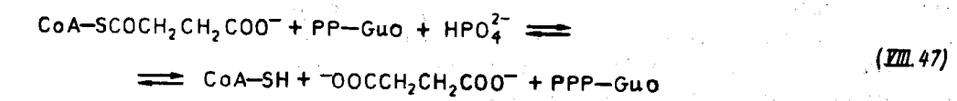
α-кетоглутарат

4. Окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата, катализируемое α-кетоглутарат дегидрогеназой, входящей в состав α-кетоглутарат дегидрогеназного комплекса (см. § 4.1), приводящее к образованию сукцинилкофермента А и выделению второй молекулы CO_2:



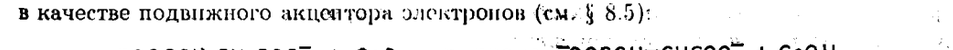
(VIII.46)

5. Фосфорилирование ГДФ, сопряженное с гидролизом макроэргической тиоэфирной связи в сукцинилкофермента А, катализируемое *сукцинат:CoA лигазой* (образующей ГДФ) и приводящее к освобождению сукцината (фермент известен под неудачным названием сукцинат тиокиназы, тогда как к киназам принято в основном относить ферменты, катализирующие перенос ортофосфата):



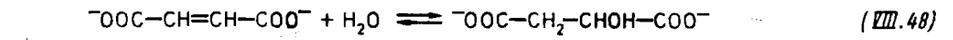
(VIII.47)

6. Превращение сукцината в фумарат, катализируемое сукцинат дегидрогеназой, входящей в состав комплекса II цепи переноса электронов с коферментом Q в качестве подвижного акцептора электронов (см. § 8.5):



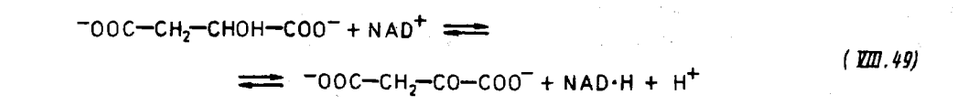
(VIII.48)

7. Гидратация двойной связи фумарата с образованием малата (соль яблочной кислоты), катализируемое фумарат гидратазой:



(VIII.49)

8. Окисление гидроксигруппы малата до кетогруппы, приводящее к регенерации оксалоацетата, катализируемое *малат дегидрогеназой*:



Термодинамические характеристики отдельных стадий цикла трикарбоновых кислот приведены в табл. 8.4. В виде схемы цикл представлен на рис. 101.

В ходе цикла трикарбоновых кислот восстанавливается до NAD·H три молекулы NAD^+, пара электронов посылается в комплексы III и IV цепи переноса электронов через кофермент Q и образуется одна макроэргическая связь в молекуле

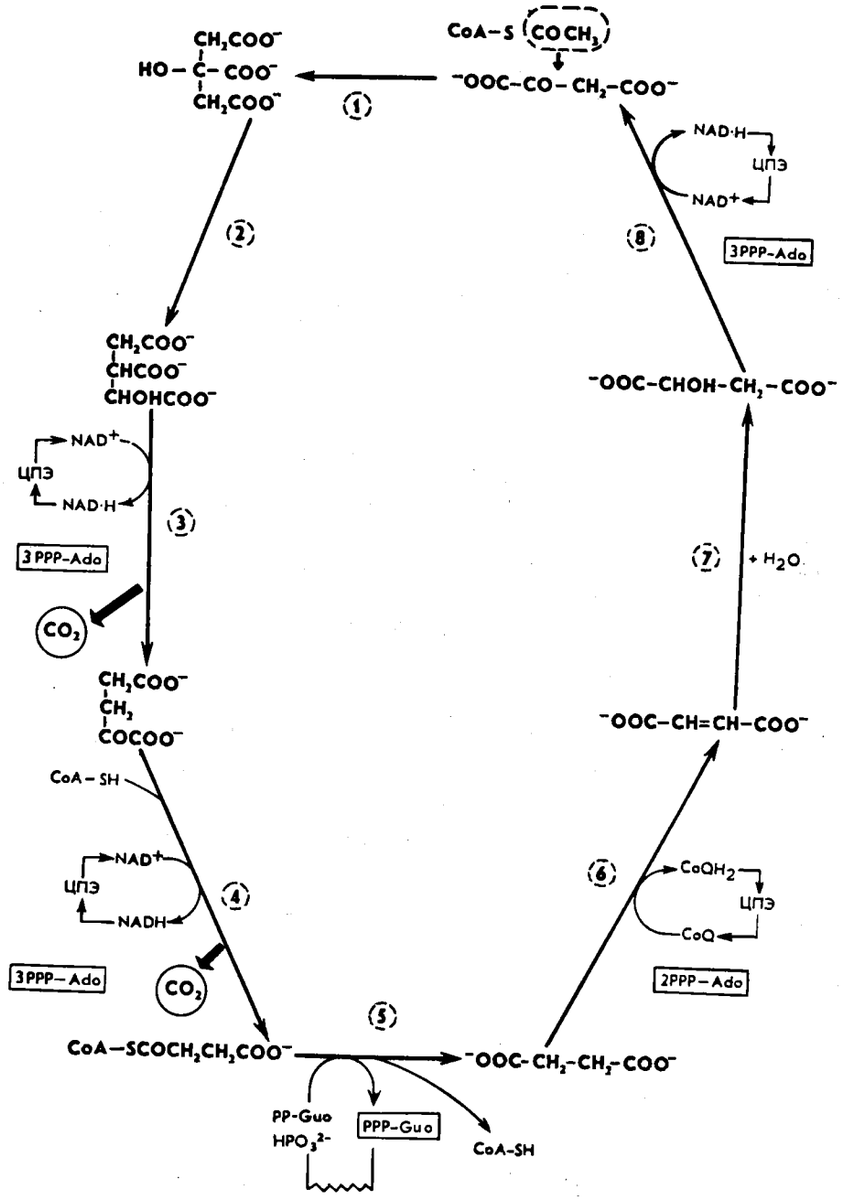


Рис. 101. Схема цикла трикарбоновых кислот (вместе со стадией окислительного декарбоксилирования пирувата):

ЦПЭ – цепь переноса электронов. Зигзагообразной линией обозначена сумма всех процессов, потребляющих энергию пирофосфатных связей в ГТФ или полученного с его помощью АТФ. В рамках обозначены молекулы АТФ, образующиеся в ЦПЭ при окислении NAD·H и $CoQH_2$. Жирными стрелками обозначена окисляемая в цикле ацетильная группа, образующиеся при ее сгорании молекулы CO_2 обведены кружком. Номера стрелок соответствуют стадиям в тексте

Таблица 8.4. Термодинамические характеристики отдельных стадий цикла трикарбоновых кислот

№ п/п	Реакция	$\Delta G^{0\prime}$, кДж/моль
1	Ацетил-CoA + Оксалоацетат + H_2O → Цитрат + CoA + H^+	−31,38
2	Цитарат ⇌ *цис*-Аконитат + H_2O	+8,37
3	*цис*-Аконитат + H_2O ⇌ Изоцитрат	−2,09
4	Изоцитрат + NAD^+ ⇌ α-Оксоглутарат + CO_2 + NADH	−8,37
5	α-Оксоглутарат + NAD^+ + CoA ⇌ Сукцинил CoA + CO_2 + NADH	−30,12
6	Сукцинил-CoA + P_i + GDP ⇌ Сукцинат + GTP + CoA	−3,35
7	Сукцинат + FAD ⇌ Фумарат + $FADH_2$	0
8	Фумарат + H_2O ⇌ Малат	−3,77
9	L-Малат + NAD^+ ⇌ Оксалоацетат + NADH + H^+	+29,71

ГТФ. С учетом АТФ, образующихся в цепи переноса электронов при окислении NAD·H и $CoQH_2$, сгорание ацетильного остатка в цикле карбоновых кислот сопровождается образованием 11 молекул АТФ и одной ГТФ, т.е. образованием 12 макроэргических пирофосфатных связей (12 биоэнергетических эквивалентов). Итоговое стехиометрическое уравнение цикла трикарбоновых кислот можно записать в виде

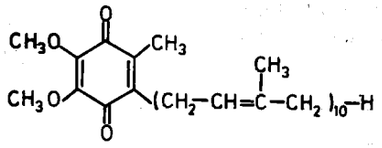
$$CoA{-}SCOCH_3 + 3NAD^+ + CoQ + PP{-}GuO + HPO_4^{2-} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CoA{-}SH + 3NAD{\cdot}H + CoQH_2 + PPP{-}GuO + 2CO_2 \qquad (\text{VIII.50})$$

8.5. ЦЕПЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

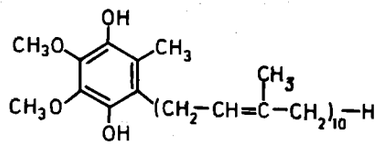
Окислительное фосфорилирование происходит в сложной системе, состоящей из значительного числа ферментов и переносчиков электронов. Эта система функционирует в мембранах, в случае митохондрий — в составе внутренней митохондриальной мембраны. Ее удается разделить на несколько сохраняющих активность комплексов, каждый из которых осуществляет одну из главных стадий цепи переноса электронов. Обычно эти комплексы обозначают как комплексы I, II, III и IV или квалифицируют как ферменты, катализирующие некоторый осуществляемый компонентами комплекса окислительно-восстановительный процесс.

Комплекс I катализирует двухэлектронное окисление NAD·H специальным промежуточным переносчиком электронов — *убихиноном* или *коферментом Q*. Последний может существовать в окисленной хиноидной (120 а) и восстановленной гидрохинонной формах (120 б), в дальнейшем обозначаемых сокращенно как CoQ и $CoQH_2$*

*Приведена структура с 10 изопентеновыми фрагментами. Встречаются разновидности кофермента с другим числом фрагментов.



120а



120б

Суммарный процесс, катализируемый комплексом I, описывается стехиометрическим уравнением

$$NAD\cdot H + H^+ + CoQ \longrightarrow NAD^+ + CoQH_2 \qquad (VIII.51)$$

Таким образом, комплекс является NAD·H кофермент Q оксидоредуктазой.

Комплекс II представляет собой систему, катализирующую окисление группы $-CH_2-CH_2-$ сукцината до *транс*-CH=CH-группы, т.е. превращение сукцината в **фумарат по реакции**

$$^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^- + CoQ \longrightarrow \begin{matrix} ^{-}OOC \\ | \\ CH=CH \\ | \\ COO^- \end{matrix} + CoQH_2 \qquad (VIII.52)$$

Таким образом, и в этом случае перенос электронов осуществляется в конечном итоге на окисленную форму кофермента Q. Ферментную систему, катализирующую этот процесс, называют *сукцинат дегидрогеназой*. Следует попутно отметить, что аналогичная реакция с ацильными остатками, связанными с коферментом A, являющаяся одним из этапов окислительной деструкции жирных кислот (см. § 8.3), происходит с участием растворимого, т.е. не связанного с мембраной фермента. Первоначально в качестве окислителя выступает связанный с ферментом флавинадениндинуклеотид (FAD, см. § 4.1), который затем передает электроны (атомы H) вспомогательному белку, *переносящему электроны флавопротеину*, а последний передает их коферменту Q в цепи переноса электронов. Обозначая соответствующие апобелки через E_1 и E_2, процессы можно представить в виде

$$E_1FAD + R-CH_2CH_2-COS-CoA \rightarrow E_1FADH_2 + R-CH=CH-COS-CoA$$
$$E_1FADH_2 + E_2FAD \rightarrow E_1FAD + E_2FADH_2$$
$$E_2FADH_2 + CoQ \rightarrow E_2FAD + CoQH_2 \qquad (VIII.53)$$

Комплекс III катализирует окисление восстановленного кофермента Q следующим, последним в цепи переноса электронов подвижным (т.е. легко выделяемым из мембраны) переносчиком — цитохромом *c*. Ниже он будет обозначаться в зависимости от степени окисления входящего в его состав иона железа как $Fe_c(II)$ или $Fe_c(III)$. Уравнение реакции, катализируемой комплексом III, записывается в виде

$$CoQH_2 + 2Fe_c(III) \rightarrow 2Fe_c(II) + 2H^+ + CoQ \qquad (VIII.54)$$

Комплекс представляет собой по катализируемой им брутто-реакции *убихинол: цитохром c оксидоредуктазу*.

Наконец, комплекс IV представляет собой цитохром *c* оксидазу, т.е. катализирует перенос электронов от ферроцитохрома *c* $Fe_c(II)$ непосредственно на кислород по реакции

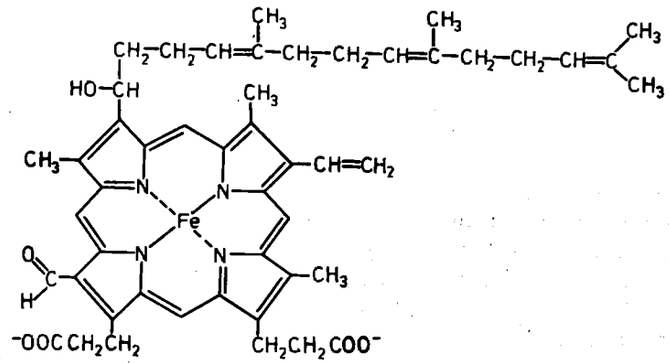
$$4Fe_c(II) + 4H^+ + O_2 \rightarrow 4Fe_c(III) + 2H_2O \qquad (VIII.55)$$

Таблица 8.5. Основные белковые компоненты, участвующие в переносе электронов в составе комплексов I—IV митохондриальной цепи переноса электронов

Комплексы	Компоненты комплексов
I	Флавопротеид (FMN), белки: FeS1, FeS2, FeS3, FeS4
II	Флавопротеид (FAD), белки; FeS_{s-1}, DeS_{s-2}, FeS_{s-3}
III	FeS_{III}, цитохромы b_k, b_{588} и c_1
IV	Цитохром *a*, цитохром a_3, Cu-белок

Каждый из комплексов содержит набор белков, несущих те или иные кофакторы. Основные компоненты представлены тремя группами белков — флавопротеидами, содержащими остаток ФАД или флавинмононуклеотида (ФМН, или FMN), гемопротеидами, содержащими железопорфириновые комплексы, и железосерными белками, обозначаемыми как FeS_j, где *j* — индекс, приписанный тому или иному компоненту железосерного белка. В состав цитохромоксидазы, как уже говорилось в § 2.6, входит медьсодержащий белок. Железосерные белки цепи переноса электронов в настоящее время изучены существенно хуже, чем упоминавшиеся в § 2.6 ферредоксины, далеко не для всех достоверно установлена даже структура железосерного кластера.

Цитохромы разделяют на подгруппы *a*, *b* и *c*. К двум последним группам относят цитохромы, содержащие обычный гем (I), или протогем. Цитохромы группы *a* содержат гем A (121), отличающийся от остальных набором заместителей в порфириновой системе:



121

Перечень белков, входящих в состав всех четырех комплексов, приведен в табл. 8.5.

Помимо комплексов, катализирующих основные окислительно-восстановительные процессы в цепи переноса электронов, при достаточно мягком разрушении внутренней митохондриальной мембраны из нее выделяется комплекс белков, обладающий способностью в изолированном состоянии катализировать гидролиз АТФ до АДФ и ортофосфата. Гидролиз ингибируется макроциклическим антибиотиком олигомицином, в связи с чем этот фермент известен как *олигомицин-чувствительная АТФаза*. При более жесткой обработке из нее удается выделить растворимую в воде, т.е. достаточно гидрофильную АТФазу, обозначаемую как F_1 АТФаза, которая, в отличие от полного комплекса, олигомицином не ингибируется. Одновременно с F_1 АТФазой выделяются мембранный фактор, являющийся гидрофобным компонентом полной АТФазы и обладающий сродством к олигомицину, и небольшой белок, который соединяет между собой F_1 АТФазу и мембранный фактор. Более чувствительная к олигомицину АТФаза содержит десять разнотипных полипептидов — пять в составе F_1 АТФазы, четыре в составе мембранного фактора и соединяющий их белок. Имеющаяся широкая совокупность экспериментальных данных практически не оставляет сомнения в том, что главная биологическая функция олигомицин-чувствительной АТФазы заключается в осуществлении обратной реакции — фосфорилировании АДФ ортофосфатом с образованием АТФ. Это АТФаза часто фигурирует в литературе как *АТФ синтаза*.

В изолированных митохондриях и в субмитохондриальных частицах, содержащих неповрежденную внутреннюю мембрану, при окислении каждой молекулы NAD·H кислородом в нормальных физиологических условиях образуются три молекулы АТФ, а при окислении одной молекулы сукцината — две молекулы АТФ. Одна молекула АТФ образуется при переносе пары электронов от восстановленного кофермента Q на феррицитохром *c*, т.е. при прохождении пары электронов через комплекс III, и еще одна молекула — при переносе пары электронов от двух молекул ферроцитохрома *c* к O_2 в комплексе IV. Таким образом, источником энергии для осуществления окислительного фосфорилирования являются реакции (VIII.51), (VIII.54) и (VIII.55), протекающие в комплексах I, III и IV. Протекающая в комплексе II реакция (VIII.52) образованием АТФ не сопровождается.

Практически общепринятой, имеющей под собой фундаментальные экспериментальные основания концепцией, объясняющей механизм сопряжения, является *хемиосмотическая гипотеза* Митчела. Согласно этой гипотезе реакции (VIII.5.1), (VIII.5.4) и (VIII.5.5), сопровождающиеся расходованием или образованием протонов, протекают на внутренней митохондриальной мембране таким образом, что протоны переносятся с внутренней стороны мембраны на внешнюю, т.е. перенос электронов сопровождается возникновением трансмембранного градиента концентрации протонов (совершением осмотической работы). Этот градиент, создающий разность химических и электрических потенциалов, и является источником энергии для протекания эндэргонического процесса образования АТФ из АДФ и ортофосфата. Олигомицин-чувствительная АТФаза согласно этой концепции является ферментом, способным использовать градиент концентрации протонов для обращения процесса гидролиза АТФ.

8.6. БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Теперь можно оценить окончательный вклад в биоэнергетику окисления одной молекулы глюкозы и одной молекулы жирной кислоты, например стеариновой $C_{17}H_{35}COOH$.

При окислительной деструкции глюкозы образуется две молекулы ацетилкофермента А, т.е. создается 24 биоэнергетических эквивалента. В сочетании с теми 14, которые образуются в ходе превращения глюкозы в ацетилкофермент А, аэробный гликолиз обеспечивает образование 38 макроэргических связей на одну молекулу глюкозы или 39 на один остаток глюкозы в составе гликогена или крахмала. Таким образом, аэробное окисление глюкозы с точки зрения биоэнергетики почти в 20 раз более эффективно, чем брожение.

При окислении стеарата в соответствии с уравнением (VIII.40) образуется 9 молекул ацетилкофермента А, что обеспечивает фосфорилирование 108 молекул АДФ. Кроме того, в соответствии с этим же уравнением для $x = 8$ образуется еще $8 \times 5 = 40$ биоэнергетических эквивалентов за счет окисления $CoQH_2$ и NAD·H. При окончательном подведении итога следует учесть, что на образование стеарилкофермента А расходуется одна молекула АТФ, в связи с чем полный биоэнергетический итог составляет $108 + 40 - 1 = 147$ макроэргических связей. Если для корректного сравнения этого итога с полученным для окисления глюкозы отнести полученную величину к шести углеродным атомам вместо 18, то получится 49 эквивалентов, т.е. заметно больше, чем в случае глюкозы. Именно с этим связано, что калорийность жиров в качестве продуктов питания выше, чем углеводов.

При стационарном функционировании цикла трикарбоновых кислот никакие главные компоненты цикла не расходуются. Однако некоторые из них необходимы для осуществления биосинтетических процессов, например для синтеза некоторых аминокислот и нуклеотидов (см. гл. 9). В связи с этим необходимо наличие процесса, пополняющего количество участников цикла. Важнейшим процессом такого рода является карбоксилирование пирувата, проходящее по схеме

$$CH_3COCOO^- + CO_2 + PPP\text{—}Ado \xrightarrow{H_2O} {}^-OOC\text{—}CH_2\text{—}CO\text{—}COO^- + PP\text{—}Ado + HPO_4^{2-} \qquad (VIII.56)$$

и катализируемое пируват карбоксилазой.

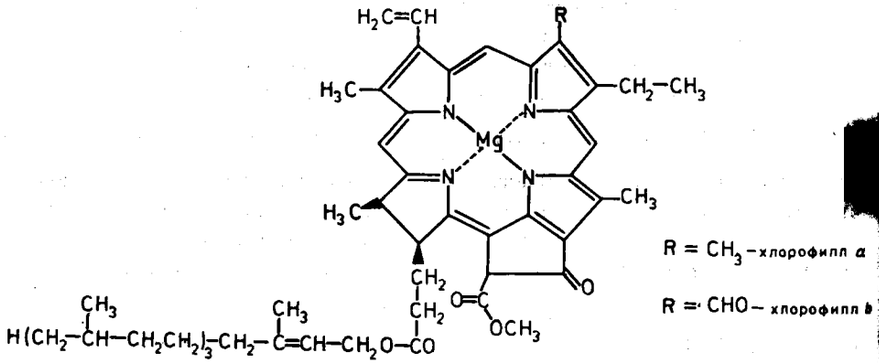
В некоторых физиологических ситуациях деградация сложных органических молекул приводит, наоборот, к образованию компонентов цикла, как это уже было показано на примере окисления жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов (§ 8.3), приводящего к образованию сукцинилкофермента А. Поэтому необходимо и наличие противоположного процесса, приводящего к превращению компонентов цикла, играющих каталитическую роль, в сгораемые компоненты. Одним из таких процессов является декарбоксилирование оксалоацетата, катализируемое *оксалоацетат декарбоксилазой* и приводящее к образованию пирувата, далее поступающего в цикл трикарбоновых кислот в виде сжигаемого компонента ацетилкофермента А:

$${}^-OOC\text{—}CH_2\text{—}CO\text{—}COO^- \longrightarrow CO_2 + CH_3COCOO^- \qquad (VIII.57)$$

8.7. СВЕТОВЫЕ СТАДИИ ФОТОСИНТЕЗА. ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

В зеленых растениях все световые стадии фотосинтеза и часть темновых стадий протекают в специальных органеллах — хлоропластах (рис. 102). Хлоропласты имеют близко примыкающие друг к другу внешнюю и внутреннюю мембраны, причем внутренняя мембрана является гладкой, т.е. не содержит каких-либо впячиваний, аналогичных кристам митохондрий. Внутреннее содержимое хлоропласта состоит из *стромы*, в которой происходят некоторые темновые стадии фотосинтеза, в том числе фиксация CO_2, и специальных структур — *тилакоидов*, которые представляют собой плоские, окруженные мембраной образования, внутренние полости которых соединены между собой. В мембрану тилакоидов вмонтированы все основные участники световых стадий фотосинтеза.

Центральным событием фотосинтеза являетя поглощение квантов видимого света, которое осуществляется специальным повсеместно распространенным в мире растений пигментом — *хлорофиллом* (122):



122

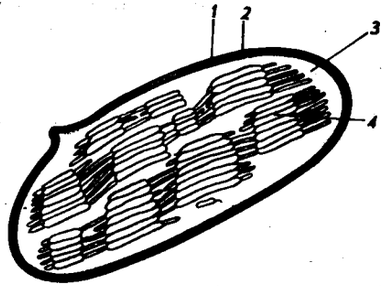


Рис. 102. Схема строения хлоропласта:

1 – внешняя мембрана; *2* – внутренняя мембрана; *3* – строма; *4* – тилакоид

Хлорофилл встречается у зеленых растений в двух модификациях — *a* и *b*, причем более распространен хлорофилл *a*. Поглощающая свет часть молекулы представляет собой порфириновую систему, координирующую ион магния. Остаток пропионовой кислоты этерифицирован спиртом фитолом, что вносит в структуру большой гидрофобный радикал, обеспечивающий взаимодействие с мембраной тилакоидов. Молекулы хлорофилла в хлоропластах организованы в крупные агрегаты, содержащие каждый сотни молекул пигмента. Это так называемые светособирающие системы, или антенны, которые обеспечивают эффективное поглощение и использование световой энергии.

В соответствии с общим уравнением (VIII.2) на световом этапе фотосинтеза происходит окисление молекул воды до O_2 и восстановление $NADP^+$ до $NADP \cdot H$. Для осуществления первого процесса необходимо создание сильного окислителя, для осуществления второго — сильного восстановителя. И то, и другое осуществляется в результате поглощения кванта видимого света хлорофиллом в двух разделенных фотохимических системах, обозначаемых соответственно как *фотосистемы II* и *I*. Молекулы хлорофилла содержат систему сопряженных связей, формируемых набором многоцентровых молекулярных орбиталей, половина из которых в невозбужденном состоянии заполнена парами электронов, а вторая половина вакантна. Расстояние между высшей заполненной и низшей незаполненной орбиталями в шкале энергий не очень велико и соответствует длине волны около 700 нм, несколько различной для фотосистем I (700 нм) и II (680 нм) в связи с различием в окружении поглощающих молекул. При поглощении света один электрон переходит на низшую незаполненную орбиталь. В гомогенном состоянии возбужденный хлорофилл возвращается в основное состояние с испусканием кванта света, т.е. в результате флуоресценции. В фотосистемах I и II этого не происходит в результате присутствия рядом с возбуждаемой молекулой двух вспомогательных пар окислитель/восстановитель. Поскольку их химическая природа не может считаться достоверно установленной, ниже они будут обозначаться для фотосистемы I как Ox_1/Red_1 и Ox_1'/Red_1', а для фотосистемы II — как Ox_2/Red_2 и Ox_2'/Red_2'. Пара Ox_1/Red_1 должна характеризоваться отрицательным значением окислительно-восстановительного потенциала с тем, чтобы ее компонент Ox_1 мог принять возбужденный электрон с образованием сильного восстановителя. При этом возбужденный хлорофилл должен превратиться в катион-радикал, который, получив электрон от восстановленного компонента Red_1' пары Ox_1'/Red_1', возвращается в исходное состояние и может принимать следующий квант света. Молекула хлорофилла вместе с двумя указанными парами образует реакционный центр фотосистемы I. Роль большого числа других молекул хлорофилла, связанных с хлорофиллом реакционного центра в один кластер, состоит в собирании квантов света, которые безызлучательным путем подаются на хлорофилл реакционного центра, т.е. играют роль антенны. Сказанное можно записать в виде следующей фотофизической (т.е. не конкретизирующей природу частиц) схемы:

$$\begin{aligned} &chl + h\nu \rightarrow chl^* \\ &chl^* + Ox_1 \rightarrow chl^+ + Red_1 \\ &chl^+ + Red_1' \rightarrow chl + Ox_1' \end{aligned} \qquad \text{(VIII.58)}$$

где chl, chl* и chl$^+$ — молекулы хлорофилла в основном, электронно-возбужденном и катион-радикальном состояниях. Возвращение в исходное состояние частицы Red_1 происходит в результате передачи ею электрона следующему переносчику или $NADP^+$, причем для восстановления одной молекулы $NADP^+$ необходимо последовательное поглощение двух квантов света.

В фотосистеме II за возбуждением молекулы хлорофилла следует передача электрона некоторой частице Ox_2', в результате чего образуется катион-радикал хлорофилла. Он принимает электрон от компонента Red_2 пары Ox_2/Red_2, обладa-

ющей высоким положительным значением окислительно-восстановительного потенциала, в результате чего образуется сильный окислитель Ox_2. Этот окислитель принимает участие в окислении молекулы воды до O_2. Схему событий, протекающих в реакционном центре фотосистемы II, можно записать в виде

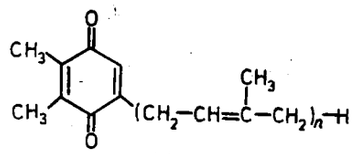
$$\begin{aligned} &chl + h\nu \rightarrow chl^* \\ &chl^* + Ox_2' \rightarrow chl^+ + Red_2' \\ &chl^+ + Red_2 \rightarrow chl + Ox_2 \end{aligned} \qquad \text{(VIII.59)}$$

Возвращение частицы Ox_2 в исходное состояние Red_2 происходит в результате передачи электрона от молекулы воды.

В приведенном виде схемы (VIII.58) и (VIII.59) не являются полными, поскольку в исходное состояние должны вернуться также частицы Ox_1' и Red_2'. Это осуществляется переносом электрона от Red_2' к Ox_1', т.е. путем передачи электрона от фотосистемы II к фотосистеме I. При этом на каждую пару перенесенных электронов приходится один акт фосфорилирования АДФ.

Сведения о химической природе компонентов, осуществляющих описанные процессы, как и в случае системы окислительного фосфорилирования, не являются полными. Ниже будут перечислены основные наиболее достоверно установленные и обстоятельно изученные компоненты.

В реакционном центре фотосистемы II присутствуют ионы марганца, принимающие непосредственное участие в окислении воды и, вероятно, выступающие в роли пары Ox_2/Red_2. Ближайшим акцептором электронов, генерируемых фотосистемой II, является *пластохинон* (123) — близкий структурный аналог убихинона, существующий в окисленной хинонной и восстановленной гидрохиноидной формах ($n = 6 \div 10$):



123

Далее в цепи переноса электронов от фотосистемы II к фотосистеме I принимают участие два цитохрома b_{559} (или b_6) и c_{552} (или f). Следующим компонентом цепи является медьсодержащий белок *пластоцианин*, от которого электрон поступает в реакционный центр фотосистемы I. Комплекс, образованный пластохиноном, цитохромами b_{559} и c_{552} и пластоцианином, по-видимому, является близким аналогом комплекса III в цепи переноса электронов в митохондриях. При прохождении через него пары электронов создается градиент концентрации протонов через мембрану тилакоидов, направленный внутрь мембраны, — pH внутри тилакоида может достигать значений 4 и ниже. Этот градиент используется вмонтированной в мембрану тилакоидов АТФазой, аналогичной митохондриальной и обычно обозначаемой как $CF_0 - CF_1$, где символ C относит ее к хлоропластам (chloroplasts), а F_0 и F_1 обозначают связанную с мембраной гидрофобную и

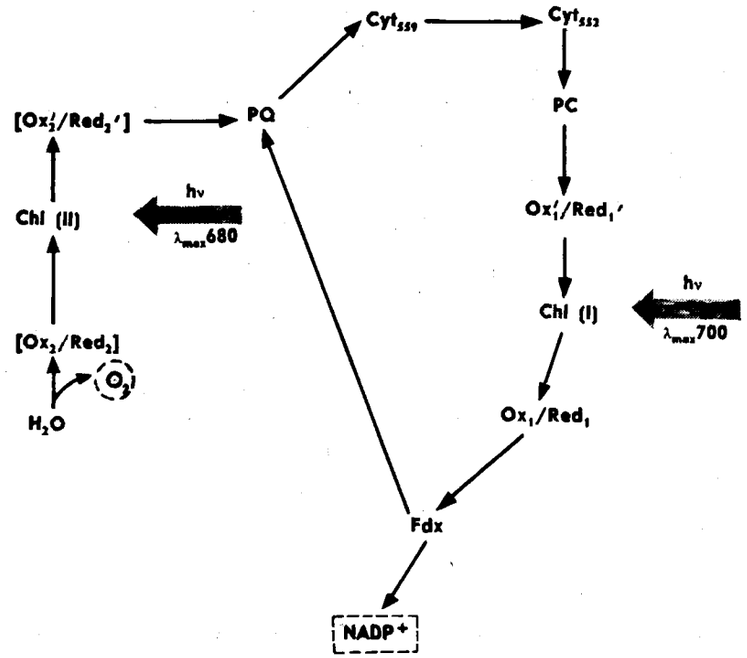


Рис. 103. Схема световых стадий фотосинтеза:

PQ - пластохинон; PC - пластоцианин; Fdx - ферредоксин; Chl(I) - фотосистема I; Chl(II) - фотосистема II. Стрелками указано направление переноса электронов

выступающую из мембраны гидрофильную часть комплекса, причем именно CF_1 является носителем каталитической активности. Эта часть экспонирована в строму, и поэтому АТФ образуется с наружной стороны тилакоида и беспрепятственно поступает в строму для участия в темновых стадиях фотосинтеза.

Фотосистема I посылает электрон на ферредоксин, который принимает участие в восстановлении $NADP^+$, также происходящем с наружной части тилакоидной мембраны, так что $NADP \cdot H$ сразу поступает в строму.

Из сказанного видно, что для восстановления одной молекулы $NADP^+$ до $NADP \cdot H$ необходимо прохождение двух электронов через обе фотосистемы, т.е. поглощение четырех квантов света. На каждую восстановленную молекулу $NADP \cdot H$ приходится одна образовавшаяся молекула АТФ. Такое соотношение между накоплением $NADP \cdot H$ и АТФ не может обеспечить даже потребности основного процесса — восстановления CO_2 до углеводов (см. § 9.1). На каждые две молекулы $NADP \cdot H$ требуется три молекулы АТФ. Кроме того, АТФ необходим для обеспечения целого ряда других энергетических, синтетических и регуляторных потребностей растительных клеток. Поэтому в хлоропластах функционирует дополнительный механизм, который обеспечивает фотосинтетическое фосфорилирование без сопутствующего восстановления никотинамидного кофермента и в котором участвует только фотосистема I. С этой целью поток электронов, поступающих от реакционного центра фотосистемы I на ферредоксин, разделяется на два. Часть их, как уже говорилось, используется для восстановления $NADP^+$, а другая направ-

ляется на цитохром b_{559} и с него возвращается в реакционный центр фотосистемы I, проходя через цитохром c_{552} и платоцианин и создавая протонный градиент через тилакоидную мембрану, используемый для фосфорилирования АДФ. Этот путь получил название *циклического фотосинтетического фосфорилирования*. На рис. 103 представлена вся описанная схема световых стадий процесса фотосинтеза в зеленых растениях.

Задачи

8.1. Оцените соотношение между глицеральдегид-3-фосфатом и дигидроксиацетонфосфатом в реакции, катализируемой триозофосфатизомеразой в равновесной смеси при стандартных условиях.

8.2. В раствор, содержащий лактатдегидрогеназу, при pH 6,0 добавили эквимолярные количества лактата и NAD^+. Найдите соотношение компонентов равновесной смеси, полагая, что обе кислоты полностью понизованы.

8.3. В систему, содержащую митохондриальные мембраны, ввели феррицитохром *c*, восстановленный кофермент Q, 1 ммоль АДФ и 50 ммоль ортофосфата. По достижении равновесия установлено, что восстановилось 50% феррицитохрома *c* и окислилось 50% кофермента Q. В каком соотношении были введены цитохром *c* и кофермент Q? Оцените соотношение между АДФ и АТФ в равновесной смеси.

8.4. Оцените КПД восстановления одной молекулы $NADP^+$ в результате световой стадии фотосинтеза.

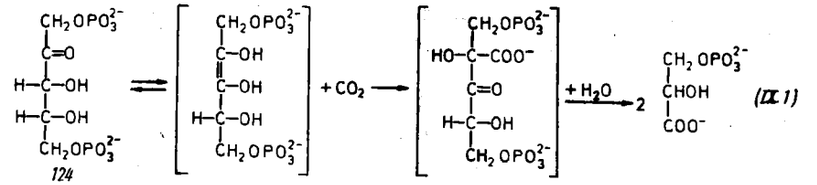
ГЛАВА 9

БИОХИМИЧЕСКИЕ ЦЕПИ И ЦИКЛЫ

В предыдущей главе показано, что конечные цели биоэнергетики достигаются в результате функционирования систем биохимических превращений, каждое из которых катализируется одним специализированным для соответствующей стадии ферментом. Эти системы представляют собой либо цепи, либо замкнутые циклы превращений. В равной степени сказанное относится и к процессам, нацеленным на получение различных необходимых живым организмам сложных органических молекул. В настоящей главе рассмотрены системы биохимических реакций, приводящие к синтезу ряда важнейших групп соединений живой природы — сахаров, липидов, аминокислот, нуклеотидов, некоторых коферментов и кофакторов. Для аминокислот рассмотрены также некоторые превращения, имеющие биоэнергетическое значение, которые используются живыми организмами в условиях недостатка углеводов и жиров и относительного избытка белков. В заключение главы на приведенном в ней материале, равно как и на материале гл. 8, сделана попытка сформулировать основные принципы организации систем биохимических процессов в живой природе.

9.1. БИОСИНТЕЗ МОНО- И ПОЛИСАХАРИДОВ

Главным поставщиком сахаров в природе является фотосинтез. Описанные в § 8.7 фотохимические процессы обеспечивают биосинтез сахаров необходимым количеством $NADP \cdot H$ и АТФ. Кроме них в превращении CO_2 в углеводы участвует 1,5-рибулозодифосфат (124), который, взаимодействуя с CO_2, распадается на две молекулы 3-фосфоглицерата, по-видимому, с образованием промежуточного продукта присоединения CO_2 к енольной форме рибулозодифосфата:



(IX.1)

Этот процесс катализируется находящимся в строме хлоропластов ферментом *рибулозодифосфат карбоксилазой*.

Дальнейшее превращение идет по цепочке реакций, представляющих собой в

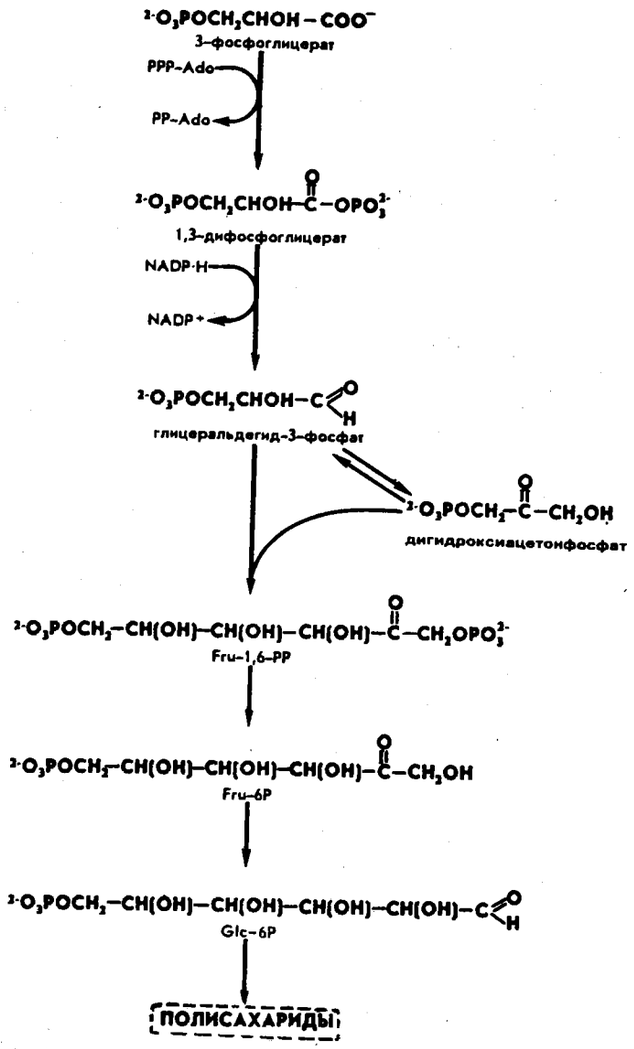


Рис. 104. Превращение 3-фосфоглицерата в гексозофосфат в цикле Кальвина

основном обращение стадий гликолиза. Схема процессов, приводящих в итоге к образованию молекулы глюкозо-6-фосфата, приведена на рис. 104. От приведенных в § 8.2 процессов ее отличает лишь восстановление 1,3-дифосфоглицерата, которое в рассматриваемом случае проходит с помощью NADP·H, в то время как при гликолизе окисление глицеральдегид-3-фосфата, приводящее к образованию 1,3-дифосфоглицерата, происходит с помощью NAD^+. Кроме того, превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат происходит путем гидролиза фосфоэфирной связи, катализируемого *фруктозодифосфатазой*, в то время как в гликолизе на фосфорилирование фруктозо-6-фосфата затрачивается макроэргическая связь в молекуле АТФ.

В итоге этого превращения на каждую образовавшуюся молекулу глюкозо-6-фосфата расходуются по две молекулы NADP·H и АТФ, полученные на световой фазе фотосинтеза. Поскольку они превращаются соответственно в $NADP^+$ и АДФ, то снова используются в световой стадии фотосинтеза для регенерации NADP·H и АТФ. Однако в дополнение к ним необратимо расходуется одна молекула рибулозо-1,5-дифосфата и для продолжения процесса должна существовать система регенерации этого соединения. Из чисто балансовых соображений следует, что из каждых шести образовавшихся молекул гексозо-6-фосфата, на которые израсходовано шесть молекул рибулозо-1,5-дифосфата, пять должны быть направлены на регенерацию шести молекул этого производного. В этой регенерации участвуют две молекулы фруктозо-6-фосфата и шесть находящихся в равновесии с ним молекул триозофосфатов. Они должны без потерь атомов углерода перейти в шесть пятиуглеродных фрагментов.

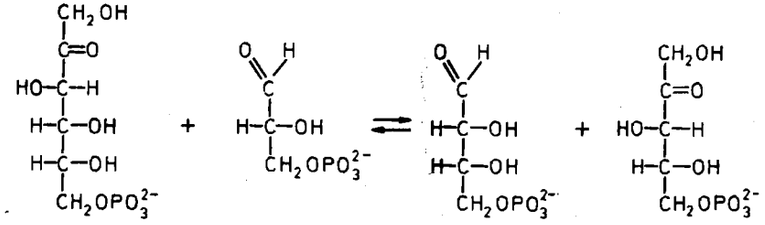
Два таких фрагмента $C^{(5)}$ образуются из двух фрагментов $C^{(6)}$ путем переноса двууглеродных фрагментов от гексозы на триозу. При этом фрагменты $C^{(3)}$ превращаются в $C^{(5)}$, но из гексоз при этом получаются фрагменты $C^{(4)}$. Они объединяются еще с двумя фрагментами $C^{(3)}$ с образованием гептоз $C^{(7)}$. Молекулы $C^{(4)}$ и $C^{(7)}$ не имеют самостоятельного значения для фотосинтеза. На завершающем этапе перестройки углеродных скелетов происходит перенос двууглеродных фрагментов от двух $C^{(7)}$ на два $C^{(3)}$ с образованием четырех пентоз. Окончательно схема переконструирования углеродных скелетов гексоз и триоз может быть записана в виде

$$2C^{(6)} + 2C^{(3)} \longrightarrow 2C^{(5)} + 2C^{(4)}$$
$$2C^{(4)} + 2C^{(3)} \longrightarrow 2C^{(7)}$$
$$2C^{(7)} + 2C^{(3)} \longrightarrow 4C^{(5)}$$

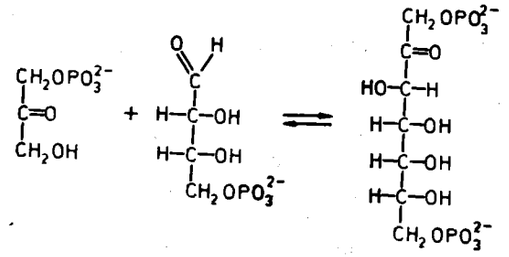
В сумме эти три превращения приводят к следующему итогу:

$$2C^{(6)} + 6C^{(3)} \longrightarrow 6C^{(5)}$$

Конкретное химическое содержание этих перестроек представлено следующими тремя реакциями, две из которых — первая и последняя — катализируются ферментом *транскетолазой*, а средняя — *альдолазой*. Первый фермент содержит в качестве кофактора тиаминпирофосфат (см. § 4.1). Перед последней перестройкой происходит удаление остатка фосфорной кислоты из положения *1* гептозы, катализируемое ферментом *седогептулозо-дифосфатазой*:



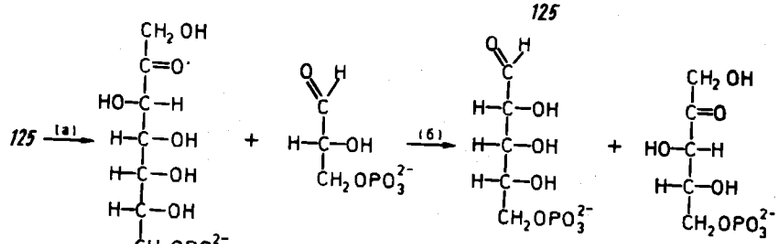
(IX.2)



(IX.3)

седогептулозо-1,7-дифосфат

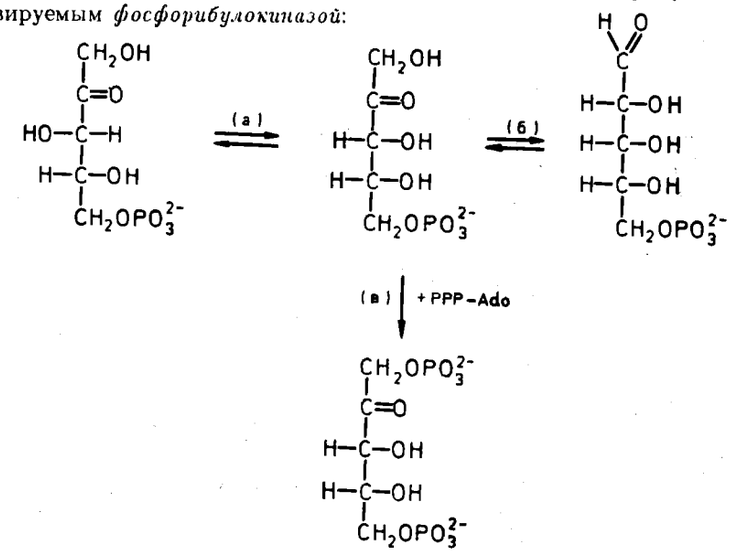
125



(IX.4)

седогептулозо-7-фосфат — рибозо-5-фосфат — ксилулозо-5-фосфат

Таким образом, итогом перестроек углеродного скелета является образование в расчете на 30 углеродных атомов двух молекул рибозо-5-фосфата и четырех молекул ксилулозо-5-фосфата. Оба эти пентозофосфата изомеризуются с образованием шести молекул рибулозо-5-фосфата с помощью двух изомераз — *рибозофосфат изомеразы* и *рибулозофосфат-3-эпимеразы* (см. § 4.5). Регенерация завершается переносом остатка фосфорной кислоты от АТФ на рибулозо-5-фосфат, катализируемым *фосфорибулокиназой*:



(IX.5)

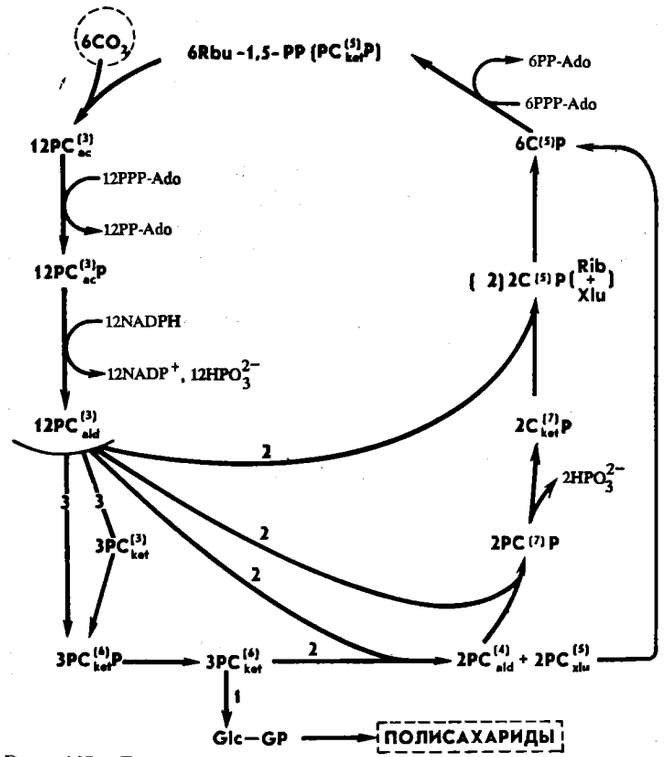


Рис. 105. Полная схема темновых стадий фотосинтеза (цикл Кальвина) в упрощенной символике:

n – число углеродных атомов, ket – кетоза, ald – альдоза, ac – карбоновая кислота; цифры над стрелками обозначают число реагирующих молекул

Вся совокупность процессов, представленная реакцией (IX.1), процессами, изображенными на рис. 104 (за исключением изомеризации фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат), и реакциями (IX.2) — (IX.5), называется *циклом Кальвина*. Полное стехиометрическое уравнение цикла Кальвина в расчете на поглощение шести молекул CO_2 записывается в виде

$$6CO_2 + 12NADP{\cdot}H + 18PPP{-}Ado \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18PP{-}Ado + 18HPO_4^{2-} + 12NADP^+ \qquad (IX.6)$$

NADP·H расходуется в единственной во всем цикле окислительно-восстановительной реакции — восстановлении 1,3-дифосфоглицерата. Расходуется 12 молекул АТФ на фосфорилирование 3-фосфоглицерата и 6 на фосфорилирование рибулозо-5-фосфата. В упрощенной для наглядности символике полная схема цикла Кальвина представлена на рис. 105.

Уравнение (IX.6) предполагает, что весь фиксированный CO_2 используется для создания новых молекул гексоз и далее полисахаридов. Практически часть образующихся углеводов используется для других биосинтетических нужд раститель-

ных клеток. В частности, рибозо-5-фосфат частично расходуется на синтез новых молекул нуклеотидов. Этот и многочисленные другие процессы, связанные с расходованием компонентов цикла Кальвина, могут происходить только за счет уменьшения количества накапливающихся гексоз, так как полная регенерация рибулозо-1,5-дифосфата является необходимым условием функционирования цикла.

У животных синтез сахаров из CO_2 и других одноуглеродных и двууглеродных предшественников отсутствует. Существует, однако, механизм, позволяющий осуществлять синтез моносахаридов и последующее превращение их в полисахариды из трехуглеродных фрагментов — участников гликолиза и четырехуглеродных фрагментов — участников цикла трикарбоновых кислот. Этот путь реализуется в условиях дефицита углеводов в продуктах питания и при наличии других компонентов, способных служить источником трех- и четырехуглеродных фрагментов. Такими компонентами могут, в частности, служить некоторые аминокислоты, например аланин, превращающийся в реакции переаминирования в пируват (см. § 4.2 и 9.4), и аспартат, превращающийся при переаминировании в оксалоацетат. Биосинтез моносахаридов из пирувата называют *глюконеогенезом*.

Первой стадией глюконеогенеза является превращение пирувата в фосфоенолпируват. Как видно из табл. 8.3, непосредственный перенос остатка фосфорной кислоты от АТФ на пируват термодинамически не выгоден. Поэтому образование фосфоенолпирувата из пирувата происходит после предварительного карбоксилирования пирувата по реакции (IV.44) в результате превращения

$$^{-}OOC{-}CH_2{-}CO{-}COO^{-} + PPP{-}Ado \longrightarrow$$
$$\longrightarrow CH_2{=}C(OPO_3^{2-}){-}COO^{-} + PP{-}Ado + CO_2 \qquad (IX.7)$$

Таким образом, на образование фосфоенолпирувата из пирувата затрачиваются две макроэргические связи — одна на карбоксилирование пирувата, катализируемое пируват карбоксилазой, и одна на фосфорилирование оксалоацетата, сопровождающееся декарбоксилированием, которое катализируется *фосфоенолпируват карбоксикиназой*.

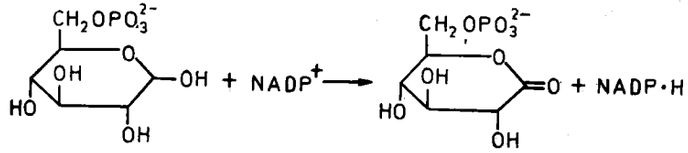
Дальнейшие стадии глюконеогенеза являются обращением гликолиза, за исключением превращения фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат, которое, как и в цикле Кальвина, происходит путем гидролиза фосфоэфирной связи. В итоге полное стехиометрическое уравнение глюконеогенеза можно записать в виде

$$2CH_3COCOO^{-} + 2NAD{\cdot}H + 6PPP{-}Ado + 2H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow Glc{-}6P + 6PP{-}Ado + 5HPO_4^{2-} + 2NAD^{+} \qquad (IX.8)$$

Сравнение с уравнением (VIII.24) для гликолиза показывает, что на образование глюкозо-6-фосфата из пирувата расходуется шесть биоэнергетических эквивалентов в расчете на одну молекулу глюкозы, в то время как превращение одной молекулы глюкозо-6-фосфата в две молекулы пирувата при гликолизе приводит к образованию всего трех макроэргических связей. Эта разница обеспечивает протекание как гликолиза, так и глюконеогенеза с отрицательным значением ΔG^0, которое в первом случае составляет −56,3 кДж/моль, а во втором — 35,2 кДж/моль.

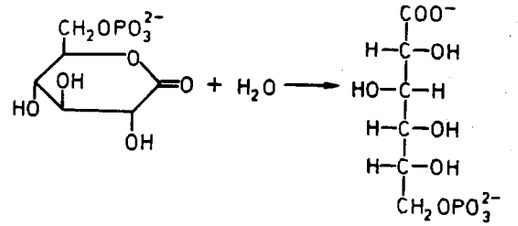
В тех случаях, когда у животных основным источником для обеспечения энергией и углеродсодержащими фрагментами для различных биосинтетических целей являются гексозы и построенные из гексоз полимеры, необходимо образование пентоз для синтеза нуклеотидов. Это осуществляется с помощью следующей цепочки превращений.

1. Окисление глюкозо-6-фосфата до глюконолактона, катализируемое *глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой*:



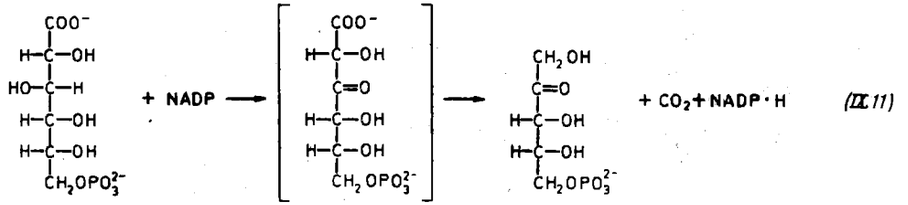
(IX.9)

2. Гидролиз 6-фосфоглюконолактона до 6-фосфоглюконата, катализируемый *глюконолактоназой*:



(IX.10)

3. Сопровождающееся декарбоксилированием окисление 6-фосфоглюконата, приводящее к образованию рибулозо-5-фосфата:



(IX.11)

катализируемое *фосфоглюконат дегидрогеназой* (декарбоксилирующей).

4. Изомеризация рибулозо-5-фосфата с образованием рибозо-5-фосфата, катализируемая рибозофосфат изомеразой.

В ходе превращения глюкозо-6-фосфата в рибозо-5-фосфат восстанавливаются две молекулы $NADP^+$, что при регенерации их окислением молекулярным кислородом в цепи переноса электронов приводит к фосфорилированию шести молекул АДФ. Таким образом, в расчете на шесть окисленных в этом процессе атомов углерода может образоваться 36 молекул АТФ, что лишь на две молекулы меньше, чем при полном сгорании одной молекулы глюкозы при гликолизе и в пос-

ледующем цикле трикарбоновых кислот. Поэтому процесс может иметь и биоэнергетическое значение. Однако если описанные реакции обеспечивают биоэнергетику живой системы, то для эффективного использования глюкозы необходима дальнейшая утилизация накапливающихся пентозофосфатов. Это достигается их превращением в гексозы путем перестройки углеродного скелета, в основном являющейся обращением перестройки гексоз в пентозы в цикле Кальвина. Схема превращений углеродного скелета может быть записана в виде

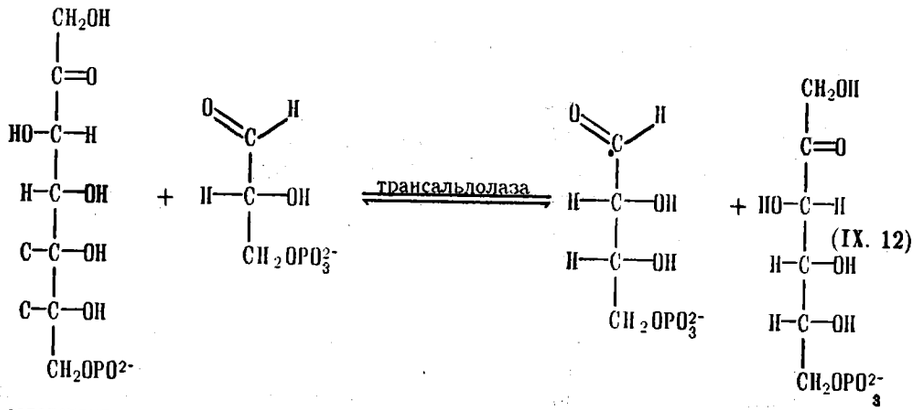
$$C^{(5)} + C^{(5)} \longrightarrow C^{(7)} + C^{(3)}$$

$$C^{(7)} + C^{(3)} \longrightarrow C^{(6)} + C^{(4)}$$

$$C^{(4)} + C^{(5)} \longrightarrow C^{(6)} + C^{(3)}$$

$$C^{(3)} \longrightarrow 1/2C^{(6)}$$

Новой по сравнению с реакциями цикла Кальвина является лишь вторая перестройка, катализируемая ферментом *трансальдолазой*:



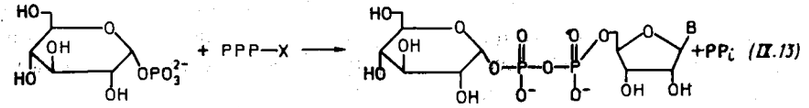
(IX. 12)

седогептулозо-7-фосфат — глицеральдегид-3-фосфат — эритрозо-4-фосфат — фруктозо-6-фосфат

Для первой, равно как и для третьей стадии необходим ксилулозо-5-фосфат, который, как и в цикле Кальвина, находится в равновесии с рибулозо-5-фосфатом в результате действия фермента рибулозо—5-фосфат 3-эпимеразы. Первая и третья реакции, участвующие в переконструировании углеродного скелета, протекают по обращенным уравнениям (IX.4) и (IX.2), а последняя представляет собой уже многократно упоминавшуюся альдольную конденсацию глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата, приводящую к образованию фруктозо-1,6-дифосфата. Образовавшийся фруктозо-1,6-дифосфат гидролизуется фруктозодифосфатазой до фруктозо-6-фосфата. В результате из трех молекул пентозофосфатов образуется две с половиной молекулы фруктозо-6-фосфата, которые после изомеризации в глюкозо-6-фосфат возвращаются в цикл и снова подвергаются окислению и декарбоксилированию.

Живая природа чрезвычайно богата различными олиго- и полисахаридами. Несмотря на это многообразие можно сформулировать некоторые достаточно общие принципы биосинтеза полимерных сахаров. Прежде всего это участие на

стадии образования олигомеров и полимеров нуклеозиддифосфатсахаров. Эти соединения получаются при взаимодействии фосфатов моносахаридов с соответствующими нуклеозидтрифосфатами, например

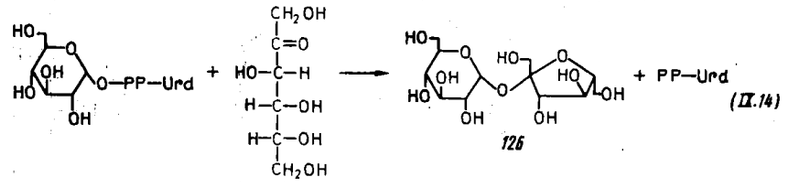


(IX.13)

где X = Urd, Ado или Guo; B = Ura, Ade или Gua.

Эти процессы катализируются соответствующими нуклеотидилтрансферазами: в случае процессов (IX.13) соответственно *глюкозо-1-фосфат уридилилтрансферазой, глюкозо-1-фосфат аденилилтрансферазой* и *глюкозо-1-фосфат гуанилилтрансферазой.*

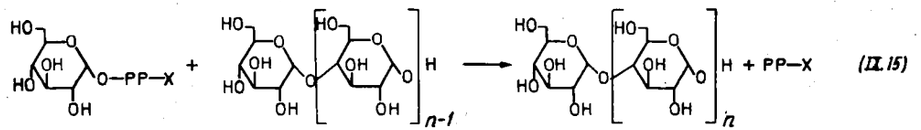
Нуклеозиддифосфатсахара (НДФ-сахара) являются донорами гликозильных остатков при биосинтезе олиго- и полисахаридов. Например, сахароза (126) — основной компонент тростникового и свекловичного сахара — образуется при взаимодействии УДФ-глюкозы с фруктозой, катализируемом *сахарозосинтазой*:



(IX.14)

126

УДФ-глюкоза служит донором гликозильных остатков и при синтезе полисахарида гликогена, катализируемом гликогенсинтазой. Аналогично протекает и синтез крахмала, однако мономером в этом случае может служить АДФ-глюкоза, а фермент, катализирующий это превращение, называют *крахмалсинтазой*. Общее уравнение биосинтеза линейной цепи этих двух полисахаридов записывается в виде



(IX.15)

(здесь X = Urd, Ado).

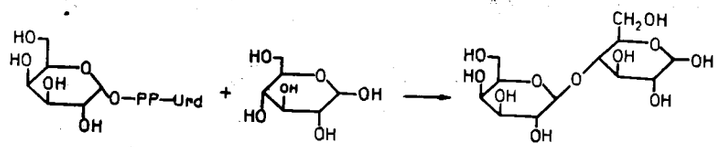
По аналогичной схеме, но с образованием β-гликозидных связей происходит образование целлюлозы из ГДФ-целлюлозы, катализируемое *целлюлозосинтазой* (образующей ГДФ).

Нетрудно убедиться, что в расчете на одну образовавшуюся гликозидную связь расходуется одна пирофосфатная связь в молекуле АТФ. Действительно, после прохождения реакции гликозилирования нуклеотидный остаток освобождается в виде нуклеозиддифосфата. Для его превращения в нуклеозидтрифосфат с целью повторного использования в реакции (IX.13) необходим перенос на него одного фосфата по реакции

$$PP{-}Urd + PPP{-}Ado \longrightarrow PPP{-}Urd + PP{-}Ado$$

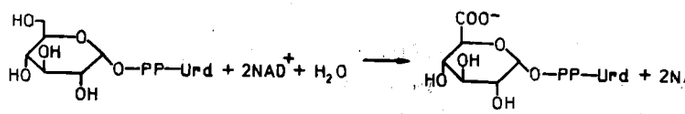
или аналогичной реакции для других нуклеотидов. Встраванию гликозильных остатков в олиго- и полисахариды предшествует большое число их превращений в составе нуклеозиддифосфатсахаров, что является важной чертой биосинтеза сахаров. Так, уже говорилось, что уридиндифосфатгалактоза образуется преимущественно путем эпимеризации в положении 4 в уридиндифосфатглюкозе (см. § 4.5). Образовавшаяся УДФ-галактоза далее используется в синтезе содержащих остатки галактозы олиго- и полисахаридов.

Например, синтез молочного сахара лактозы, катализируемый *лактозосинтазой*, протекает по реакции



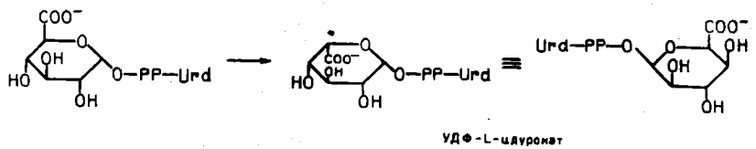
(IX.16)

В качестве примера более сложного превращения, протекающего с нуклеозиддифосфатсахарами, можно привести биосинтез УДФ-идуроната, принимающего участие в образовании полисахарида соединительной ткани дерматансульфата (см. § 2.2). На первой стадии УДФ-глюкоза превращается в УДФ-глюкуронат по реакции



(IX.17)

катализируемой *УДФ-глюкоза дегидрогеназой*. Затем происходит эпимеризация положении 5 УДФ-глюкуроната, в результате чего последний превращается УДФ-L-идуронат:



(IX.18)

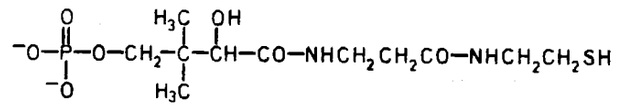
Процесс катализируется *УДФ-глюкуронат 5′-эпимеразой*.

9.2. БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ФОСФОЛИПИДОВ

Существует два основных пути биосинтеза липидов. Первый путь основан на синтезе жирных кислот из ацетилкофермента А с дальнейшим превращением их в жиры, воска, фосфолипиды и некоторые другие более специализированные биологически активные вещества, например в простагландины. Второй путь имеет в своей основе синтез изопентенильных производных, из которых образуются многочисленные соединения с разветвленной цепью и циклические структуры, в том числе различные терпены и стероиды. Этот путь рассматривается в следующем параграфе.

Биосинтез жирных кислот в главных своих чертах представляет собой обращение пути окислительной деструкции жирных кислот, описанной в § 8.3. Он приводит к кислотам, содержащим четное число углеродных атомов. У эукариот ацетилкофермент А преимущественно образуется в митохондриальном матриксе, в то время как биосинтез жирных кислот проходит в цитоплазме. Поэтому необходим транспорт активированных ацетильных остатков через митохондриальные мембраны. Для самого ацетилкофермента А эти мембраны непроницаемы. Поэтому транспорт проходит с помощью вспомогательного переносчика, роль которого играет уже описанный в § 8.3 карнитин. Как в матриксе, так и в цитоплазме осуществляется перенос ацетильного остатка между коферментом А и карнитином, протекающий по уравнению (VIII.33) и катализируемый специальным ферментом *карнитин ацетилтрансферазой*.

В отличие от окислительной деструкции, которая происходит с ацильными остатками, связанными с коферментом А, сборка ацильных остатков происходит на специальном небольшом белке, называемым *ацил-переносящий белок*, который в дальнейшем обозначается как ACP (acyl carrier protein) или ACP — SH. Его функциональной группой, как и в случае кофермента А, является SH-группа *фосфопантотеина*



связанного с белком фосфоэфирной связью через гидроксигруппу серина. После образования в цитоплазме ацетилкофермента А часть ацетильных остатков переносится на ACP по реакции

$$CoA{-}SCOCH_3 + ACP{-}SH \rightleftharpoons CoA{-}SH + ACP{-}SCOCH_3 \qquad (IX.19)$$

катализируемой *ACP-ацетилтрансферазой*.

Параллельно с этим происходит карбоксилирование ацетилкофермента А по реакции

$$CoA{-}SCOCH_3 + CO_2 + PPP{-}Ado + H_2O \longrightarrow CoA{-}SCOCH_2COO^- + PP{-}Ado + HPO_4^{2-} \qquad (IX.20)$$

приводящей к образованию малонилкофермента А и катализируемой *ацетил-CoA карбоксилазой*. Образовавшийся малонильный остаток также переносится на ацил-переносящий белок

$$CoA{-}SCOCH_2COO^- + ACP{-}SH \rightleftharpoons CoASH + ACP{-}SCOCH_2COO^- \quad (IX.21)$$

с помощью *ACP-малонилтрансферазы*.

Удлинение цепи начинается с переноса ацетильного фрагмента с $ACP{-}SCOCH_3$ на CH_2-группу малонильного фрагмента $ACP{-}SCOCH_2COO^-$

$$ACP{-}SCOCH_2COO^- + ACP{-}SCOCH_3 \longrightarrow ACP{-}SCOCH_2COCH_3 + CO_2 \quad (IX.22)$$

который осуществляется с помощью фермента *3-кетоацил-ACP-синтазы* и сопровождается выделением CO_2. Этот же фермент на последующих стадиях роста цепи катализирует перенос более длинных ацильных остатков на CH_2-группу метилмалонил-ACP.

Последующие стадии цикла удлинения углеродной цепи представляют собой обращение соответствующих реакций, происходящих при окислительной деградации, — восстановление 3-кетогруппы до 3-гидроксигруппы, дегидратация $CH_2{-}CHOH$-фрагмента с образованием фрагмента $CH{=}CH$ и восстановление его до $CH_2{-}CH_2$. Первая стадия

$$ACP{-}SCOCH_2COCH_3 + NADP{\cdot}H \rightleftharpoons ACP{-}SCOCH_2CHOHCH_3 + NADP^+ \quad (IX.23)$$

катализируется *3-кетоацил-ACP-редуктазой*.

Вторая стадия

$$ACP{-}SCOCH_2CHOHCH_3 \rightleftharpoons ACP{-}SCOCH{=}CHCH_3 + H_2O \quad (IX.24)$$

катализируется *кротонил-ACP-гидратазой*. Цикл завершается процессом

$$ACP{-}SCOCH{=}CHCH_3 + NADP{\cdot}H + H^+ \longrightarrow ACP{-}SCOCH_2{-}CH_2{-}CH_3 + NADP^+ \quad (IX.25)$$

катализируемым *еноил-ACP-редуктазой*.

По завершении этого первого цикла осуществляется перенос бутирильного остатка на малонил-ACP

$$ACP{-}SCOCH_2COO^- + ACP{-}SCOCH_2CH_2CH_3 \longrightarrow ACP{-}SH + ACP{-}SCOCH_2COCH_2CH_2CH_3 \quad (IX.26)$$

и начинается новая серия реакций (IX.23) — (IX.25), приводящая в итоге к восстановлению следующей 3-кетогруппы до CH_2-группы.

Из приведенных реакций следует, что наряду с чертами сходства биосинтез жирных кислот имеет ряд существенных отличий от окислительной деградации жирных кислот.

Во-первых, на всем протяжении роста и восстановления углеродной цепи она связана с ацил-переносящим белком, а не с коферментом А. Во-вторых, удлинение углеродной цепи происходит с участием малонил-ACP, на образование которого расходуется одна макроэргическая связь в молекуле АТФ. При окислительной деструкции перенос 3-кетоацильного остатка на SH-группу кофермента А происходит непосредственно, без какой-либо реакции, способствующей образованию АТФ.

В-третьих, в качестве восстановителя кетогруппы до гидроксигруппы функционирует NADP·H, в то время как окисление 3-гидроксиацилкофермента А до 3-кетоацилкофермента А проходит с помощью NAD^+. В-четвертых, восстановление $CH{=}CH$-фрагмента до $CH_2{-}CH_2$ происходит с помощью NADP·H, в то время как окисление $CH_2{-}CH_2$-группы до $CH{=}CH$ в ацилкоферменте А происходит с использованием кофермента Q в качестве подвижного акцептора электронов. Последнее отличие вытекает непосредственно из рассмотрения окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих пар. Значение $E^{0\prime}$ для пары $NAD^+/NADH$ — 0,32 В показывает, что ни NAD^+, ни NDP^+ не могут служить эффективными окислителями в реакции превращения бутирилкофермента А в кротонилкофермент А, поскольку для последней пары E^0 составляет 0,19 В. Для этого превращения необходим более сильный окислитель, каковым является кофермент Q ($E^{0\prime}$ = = 0,10 В). Но по той же причине восстанавливающая способность NADP·H более чем достаточна для превращения группы $CH{=}CH$ в $CH_2{-}CH_2$.

На стадии (IX.24) по мере удлинения углеродной цепи подключаются ферменты с изменяющейся специфичностью. Например, дегидратация фрагментов длиной 8—12 углеродных атомов катализируется главным образом *3-гидроксиоктаноил-ACP дегидратазой*.

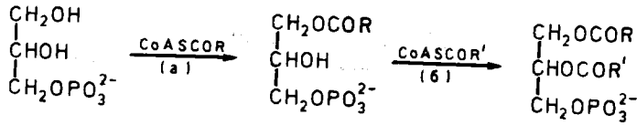
Общий баланс одного цикла можно записать в виде

$$CoA{-}SCOCH_3 + ACP{-}SCO(CH_2CH_2)_{x-1}CH_3 + 2NADP{\cdot}H + PPP{-}Ado \longrightarrow ACP{-}SCO(CH_2CH_2)_xCH_3 + CoA{-}SH + 2NADP^+ + PP{-}Ado + HPO_4^{2-} \quad (IX.27)$$

С учетом биоэнергетической значимости NADP·H (возможность образования трех молекул АТФ при окислении в цепи переноса электронов) можно считать, что на один цикл удлинения углеродной цепи при биосинтезе жирных кислот затрачивается семь биоэнергетических эквивалентов. В то же время, как следует из материала, изложенного в § 8.3, один цикл окислительной деструкции может обеспечить фосфорилирование в цепи переноса электронов всего пяти молекул АДФ: трех за счет образовавшегося NAD·H и двух в результате восстановления CoQ. Эта разница, как и в случае глюконеогенеза, обеспечивает удлинение углеродной цепи необходимым количеством энергии, превращая его из эндэргонического процесса, каковым является обращение цикла окислительной деструкции, в экзэргонический.

Вторым общим компонентом жиров и важнейших фосфолипидов является глицерин. Источником глицеринового фрагмента служит дигидроксиацетонфосфат, который восстанавливается с помощью NAD·H в реакции, катализируемой *глицерин-3-фосфат дегидрогеназой*. Далее проходит двуступенчатое ацилирование обеих гидроксигрупп с использованием ацилкофермента А в качестве ацилиру-

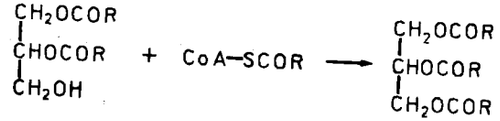
ющего агента. Процесс катализируется двумя ферментами — *глицерофосфат ацилтрансферазой* и *1-ацилглицерофосфат ацилтрансферазой*



(IX.28)

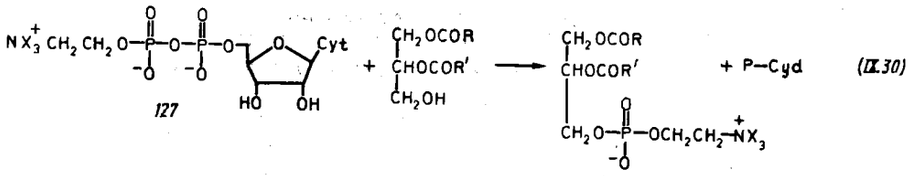
Ацилкофермент А образуется при переносе ацильного остатка от ацил-ACP по реакции, аналогичной (IX.19). Итогом этих превращений является образование фосфатидатов. Далее превращения могут идти двумя основными путями.

Один путь начинается с гидролиза фосфатидата специфичной *фосфатидат-фосфатазой* и приводит к образованию 1,2-диацилглицерина. Последний может ацилироваться ацилкоферментом А с помощью фермента *диацилглицерин ацилтрансферазы* с образованием триглицеридов, т.е. жиров:



(IX.29)

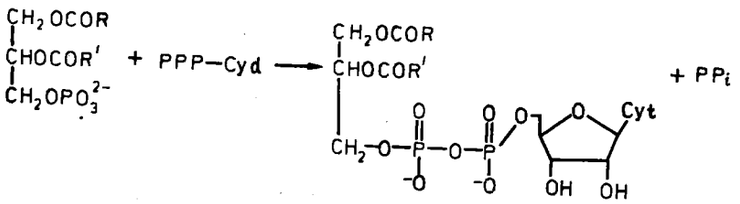
На этом же пути могут образовываться важнейшие фосфолипиды (127) — фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. Эти процессы происходят с участием производных этаноламина и холина, содержащих остатки цитидиндифосфата — ЦДФ-холин (76а) и ЦДФ-этаноламин (76б). Реакция их образования из ЦТФ и соответствующих гидроксисоединений приведена в § 4.2. Эти соединения реагируют с диацилглицерином по реакции



(IX.30)

(а) X=CH_3; (б) X=H, катализируемой соответственно *этаноламин фосфотрансферазой* и *холин фосфотрансферазой*.

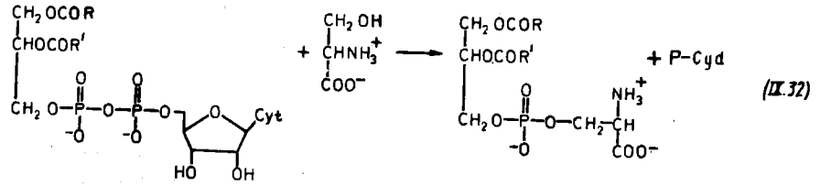
Второй путь биосинтеза фосфолипидов исходит из фосфатидата, который взаимодействует с ЦТФ с участием фермента *фосфатидат цитидилилтрансферазы* с образованием ЦДФ-диацилглицерида:



(IX.31)

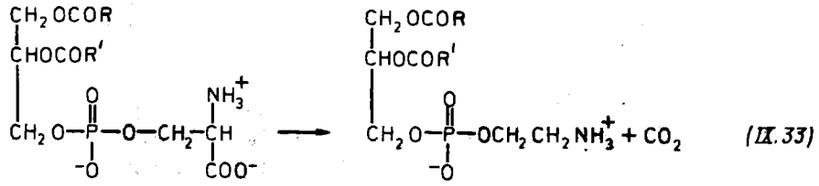
Образовавшееся производное ЦДФ реагирует со спиртовыми группами при участии соответствующих специфичных к определенным спиртам трансфераз.

В частности, в реакции с серином, катализируемой *фосфатидилсерин синтазой*



(IX.32)

образуется фосфатидилсерин. Последний может подвергаться декарбоксилированию *фосфатидилсерин декарбоксилазой* с образованием фосфатидилэтаноламина:



(IX.33)

Поскольку остаток этаноламина может замещаться на остаток серина, итогом этих двух превращений является постепенное превращение серина в этаноламин. Фосфатидилэтаноламин может служить источником лецитина, подвергаясь последовательному трехкратному метилированию аминогруппы с помощью S-аденозилметионина.

9.3. БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ, ПОСТРОЕННЫХ ИЗ ИЗОПЕНТИЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДОВ

Вторая важная и весьма разнообразная группа липидов берет свое происхождение от *изопентенилпирофосфата* и изомерного ему *диметилаллилпирофосфата*. Схема их образования представлена на рис. 106.

Исходным соединением и в этом случае является ацетилкофермент А. Первая стадия — образование ацетоацетилкофермента А — является обращением последней стадии деструкции жирных кислот, катализируемой *ацетил-CoA ацетилтрансферазой*. За ней следует взаимодействие с метильной группой ацетильного остатка третьей молекулы ацетилкофермента А, причем атакуется атом С3 кетогруппы ацетоацетильного остатка (стадия 1).

Процесс сопровождается гидролизом тиоэфирной связи между атакующим ацетильным остатком и SH-группой кофермента. Нетрудно заметить, что реакция сходна с образованием лимонной кислоты в цитратсинтазной реакции. Продуктом является в данном случае 3-гидрокси-3-метилглутарилкофермент А (128). Фермент, катализирующий реакцию, называется *гидроксиметилглутарилкофермент А синтаза*. Следующая стадия (2) — двукратное восстановление тиоэфирной группы до SH-группы свободного кофермента А и гидроксигруппы с помощью NADP·H —

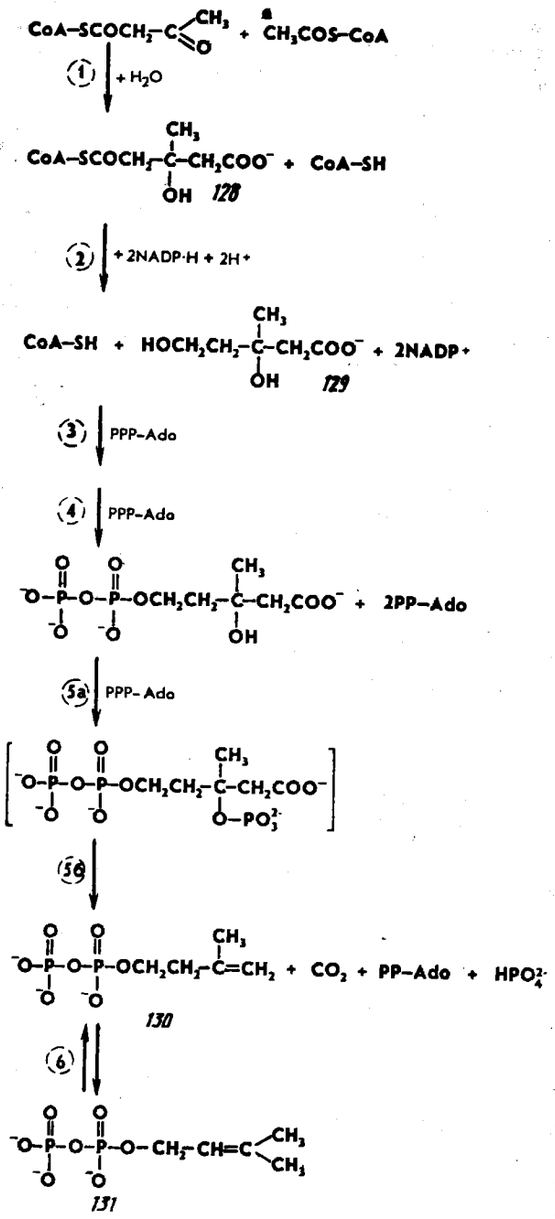


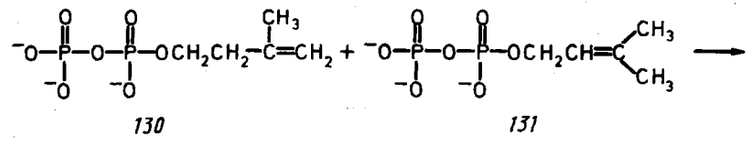
Рис. 106. Схема образования изопентенилпирофосфата и диметилаллилпирофосфата. Номера стадий соответствуют используемым в тексте

приводит к образованию 3,5-дигидрокси-3-метилвалерата или *мевалоната* (129) (соль мевалоновой кислоты). Эта стадия катализируется *гидроксиметилглутарилкофермент А редуктазой*.

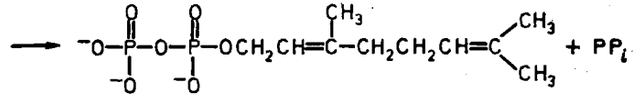
Мевалонат далее подвергается фосфорилированию по 5-гидроксигруппе с помощью *мевалонат киназы* (стадия 3) и повторному фосфорилированию по фосфату с помощью *5-фосфомевалонат киназы* (стадия 4). Фосфорилирующим реагентом в обеих стадиях является АТФ. За этим следует декарбоксилирование мевалонат-5-дифосфата, осуществляемое с помощью фермента *пирофосфомевалонат декарбоксилазы* (стадии 5а, 5б). В реакции принимает участие АТФ, которая, по-видимому, является донором фосфата для образования промежуточного 3-фосфо-5-дифосфомевалоната, далее декарбоксилирующегося с элиминацией 3-фосфата и образованием изопентенилпирофосфата (130). Последний с помощью *изопентенилдифосфат-Δ-изомеразы* частично превращается в диметилаллилпирофосфат (131). Эти два пирофосфата являются предшественниками ряда линейных и циклических гидрофобных структур.

Ниже основное внимание будет уделено чрезвычайно важному для животных и человека и наиболее сложному пути превращения этих предшественников — биосинтезу стероидов.

Процесс начинается с взаимодействия изопентенил- и диметилаллилпирофосфатов по реакции

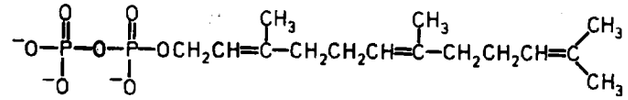


(IX.34)



132

которая приводит к образованию *гераниллирофосфата* (132) и катализируется *диметилаллилтрансферазой*. Далее совершенно аналогичная реакция с еще одной молекулой изопентенилпирофосфата, катализируемая *геранилтрансферазой*, приводит к *фарнезилпирофосфату* (133):



133

Дальнейшее превращение состоит в соединении двух углеводородных остатков фарнезилпирофосфата с образованием углеводорода сквалена.

Схема процесса образования сквалена приведена на рис. 107.

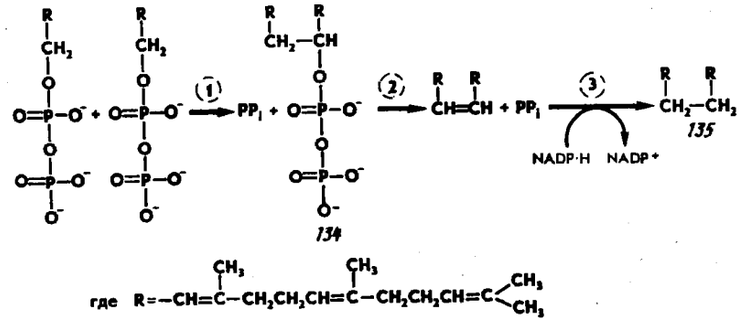
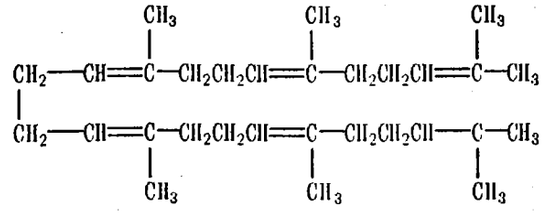
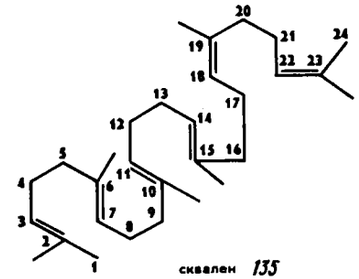


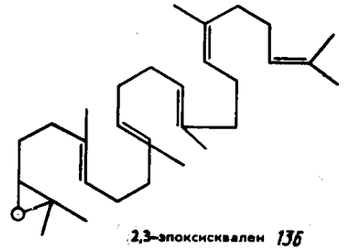
Рис. 107. Схема образования сквалена

Промежуточным соединением является пресквален пирофосфат (134):



135





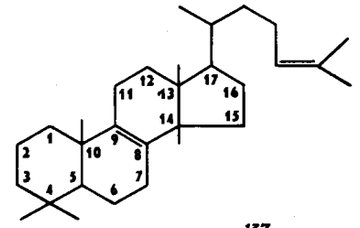


Рис. 108. Структура сквалена (135), 2,3-эпоксисквалена (136) и ланостерина (137) и нумерация атомов С в сквалене и стероидах

который образуется при участии фермента *прескваленсинтазы*. В своей полимерной форме этот фермент способен также проводить реакцию восстановления двойной связи в пресквалене с помощью NADP·H, что приводит к образованию *сквалена*.

Характерная для стероидов циклопентанпергидрофенантреновая структура образуется в результате сложного процесса, который претерпевает 2,3-эпоксисквален (136), превращающийся при этом в соединение, имеющее характерную для стероидов систему конденсированных гетероциклов — *ланостерин*. На рис. 108 представлены углеродные скелеты сквалена (135), 2,3-эпоксисквалена (136) и ланостерина (137). У последнего нумерация атомов приведена в виде, принятом для стероидов, и поэтому не совпадает с естественной нумерацией для сквалена. Из сравнения приведенных структур видно, что в ходе реакции, катализируемой скваленоксидциклазой, происходит атака атома С2 сквалена на атом С7, атома С6 на атом С11, атома С10 на атом С15 и атома С14 на атом С18. Этот процесс нетрудно представить себе как последовательное или синхронное взаимодействие карбокатионов, образующихся при атакующих атомах, и индуцированное протонированием эпоксидного кольца. Однако, судя по конечному итогу, циклизация дополнительно осложнена миграцией метильной группы из положения 10 по нумерации для сквалена (положение 8 в стероидной нумерации) в положение 14 и двойной связи из положения С18—С19 в положение С10—С11 в нумерации для сквалена (С8—С9 в стероидной нумерации). Процесс катализируется ферментом *ланостеринсинтазой*.

Если сравнить структуру ланостерина с приведенными в § 2.4 структурами холестерина и некоторых половых стероидных гормонов, то видно, что уже для получения холестерина из ланостерина нужны довольно глубокие и заведомо многостадийные превращения.

Прежде всего уже у холестерина отсутствуют обе метильные группы при атоме 4 и метильная группа при атоме 14 (стероидная нумерация). Кроме того, в холестерине отсутствует двойная связь в боковой цепи. Превращение в прогестерон требует удаления большей части бокового радикала, а при биосинтезе тестостерона и эстрадиола этот радикал полностью элиминируется. Кроме того, эти превращения должны сопровождаться некоторыми окислительно-восстановительными перестройками в самой системе конденсированных циклов. В настоящее время изучены лишь отдельные стадии этих сложных процессов и лишь отдельные катализирующие их ферменты.

Как уже говорилось, изопентенильные фрагменты используются для образования широкого спектра гидрофобных структур. Из приведенных в § 2.5 структур некоторых терпенов — гераниола, ментола, камфоры — нетрудно усмотреть, что их углеродный скелет построен из изопентенильных фрагментов.

Полимеризация изопентенилпирофосфата приводит к образованию природного каучука в каучуконосных растениях, которое катализируется ферментом *каучук цис-полипренил-цис-трансферазой*. Наконец, присоединение нескольких изопентенильных фрагментов используется для придания гидрофобности ряду важных молекул, участвующих в переносе электронов и функционирующих в мембранных системах: пластохинону (см. § 8.7), убихинону (см. § 8.5), хлорофиллу (боковой радикал фитол).

9.4. МЕТАБОЛИЗМ АЗОТА

Все элементы, входящие в состав живых организмов, находятся в состоянии непрерывного обмена между биосферой, т.е. совокупностью всех живых организмов, и средой их обитания — атмосферой, гидросферой, почвами. Однако значение и масштаб этого обмена резко различаются для разных биогенных элементов. Особенно интенсивным этот обмен является в случае углерода, водорода и кислорода, поскольку он лежит в самой основе существования подавляющего большинства современных живых организмов, в том числе всех высших животных и растений. Жизнедеятельность животных неразрывно связана с непрерывным окислением органических соединений до воды и CO_2 атмосферным кислородом. Основой жизнедеятельности растений является фотосинтез, в ходе которого из воды извлекаются атомы Н для восстановления CO_2 до сложных органических молекул.

Четвертый важнейший биогенный элемент — азот — в этом отношении кардинально отличается от трех предыдущих. Практически весь азот в составе живых организмов находится в степени окисления —3, соответствующей аммиаку или иону аммония, и подавляющее большинство жизненно важных биохимических процессов, в которых участвуют азотсодержащие соединения, происходит без изменения степени окисления азота. Исключение составляют лишь некоторые почвенные бактерии, способные превращать ионы аммония в нитраты и нитриты, которые составляют существенную часть запасов азота в почве. В таком виде азот может усваиваться почвенными бактериями и растениями, которые обладают ферментными системами, катализирующими восстановление нитритов и нитратов до аммонийной формы и обеспечивающими тем самым возможность поступления азота в состав аминокислот, нуклеотидов и других классов азотсодержащих веществ, функционирующих в живых организмах.

Однако часть азота все же ускользает из биосферы, в первую очередь в результате деятельности специальных бактерий, восстанавливающих нитриты до молекулярного азота N_2. Поэтому существует необходимость пополнения запасов азота в биосфере. Источником его является фиксация азота некоторыми спе-

циальными видами бактерий, которые известны как азотфиксирующие бактерии. Масштаб фиксации атмосферного азота этими бактериями оценивается величиной порядка 10^7—10^8 т в год, что на несколько порядков ниже масштаба фиксации CO_2, но все же составляет достаточно внушительную величину.

Ввиду огромного практического значения проблемы питания азотом сельскохозяйственных растений ферментная система, обеспечивающая фиксацию N_2, является предметом интенсивного исследования. Эта система, известная как *нитрогеназа*, катализирует шестиэлектронное восстановление N_2 до ионов аммония по уравнению

$$N_2 + 6e + 8H^+ \rightarrow 2NH_4^+ \qquad (IX.35)$$

Изученные образцы нитрогеназы состоят из двух основных компонентов — редуктазы и собственно нитрогеназы. Оба компонента имеют в своей основе ферредоксины, содержащие железосерные кластеры (см. § 2.6), а нитрогеназа, кроме того, содержит молибден. Редуктаза, обеспечивающая подачу на нитрогеназу электронов с высокой восстанавливающей способностью, при своем функционировании расходует АТФ. Для бактерий *Clostridium pasteurianum*, из которых она впервые была выделена, расход АТФ оценивается в 12 молекул на каждую восстановленную молекулу N_2.

Ионы аммония могут вводиться в состав органических молекул непосредственно по реакциям, катализируемым соответствующими ферментами, принадлежащими классу синтетаз. Например, глутамин образуется из глутаминовой кислоты и иона аммония по реакции

$$^-OOC{-}CH(NH_3^+)CH_2CH_2COO^- + NH_4^+ + PPP{-}Ado \longrightarrow$$
$$\longrightarrow {}^-OOC{-}CH(NH_3^+)CH_2CH_2CONH_2 + PP{-}Ado + HPO_4^{2-} \qquad (IX.36)$$

при участии *глутамин синтетазы*. Однако в большинстве случаев азотсодержащие группы поступают в биологические молекулы с помощью промежуточных переносчиков. К их числу прежде всего относится глутамат, который образуется по реакции

$$^-OOC{-}COCH_2CH_2COO^- + NH_4^+ + NAD(P)\cdot H \longrightarrow$$
$$\longrightarrow {}^-OOC{-}CH(NH_3^+)CH_2CH_2COO^- + NAD(P)^+ + H_2O \qquad (IX.37)$$

катализируемой *глутамат дегидрогеназами*, работающими с участием либо NAD·H, либо NADP·H. Глутамат далее участвует в многочисленных реакциях переаминирования с различными кетокислотами. Многие примеры таких реакций рассматриваются в следующем параграфе.

Вторым важным переносчиком азота является аспартат, который образуется из ионов аммония и фумарата в реакции

$$^-OOC{-}CH(NH_3^+)CH_2COO^- \rightleftharpoons (транс\text{-}) {}^-OOCCH{=}CHCOO^- + NH_4^+ \qquad (IX.38)$$

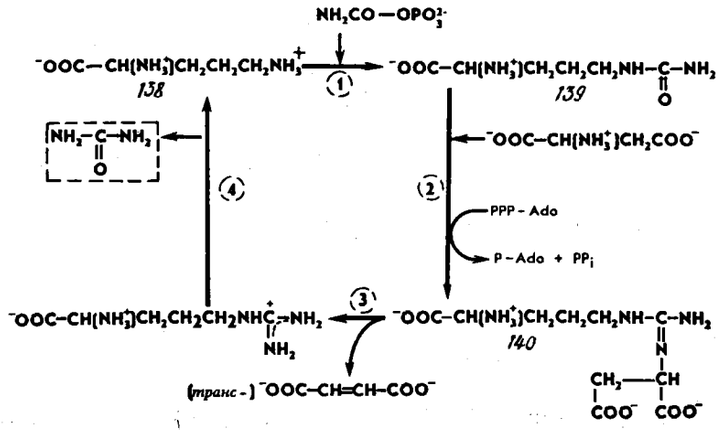


Рис. 109. Цикл мочевины (номера стадий соответствуют используемым в тексте)

катализируемой *аспартат аммиак-лиазой*. Кроме того, донором азота в ряде процессов является γ-NH_2-группа глутамина.

Реакции (IX.37) и (IX.38) являются обратимыми и играют роль не только в образовании азотсодержащих соединений, но и в выводе азота из органических молекул, если они подлежат дальнейшей деструкции в биоэнергетических целях или должны использоваться как сырье для синтеза других, не содержащих атомов N, классов органических молекул. Так, уже говорилось, что аминокислоты в определенных физиологических ситуациях могут использоваться для биосинтеза сахаров путем глюконеогенеза. Для этого необходимо удаление аминогрупп, которое достигается путем реакции переаминирования с *α*-кетоглутаратом. Удаление аминогруппы из образующегося глутамата может происходить путем обращения глутаматдегидрогеназной реакции.

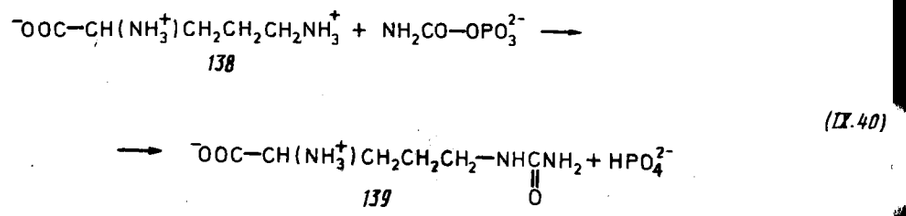
Происходящее при этих процессах накопление аммиака не может продолжаться неограниченно вследствие токсичности повышенных концентраций ионов аммония. Поэтому в условиях избытка ионов аммония должен существовать путь вывода избыточных солей аммония из организма. У млекопитающих это осуществляется путем превращения их в мочевину в специальном *цикле мочевины*, схема которого приведена на рис. 109.

Аммиак в цикл мочевины поступает в виде аминогруппы аспартата, который может образовываться по реакции (IX.38), и в виде карбамоилфосфата, образующегося по реакции

$$NH_4^+ + CO_2 + 2PPP{-}Ado \longrightarrow NH_2CO{-}OPO_3^{2-} + 2PP{-}Ado + HPO_3^{2-} \qquad (IX.39)$$

катализируемой *карбамоилфосфат синтетазой*. В цикле в качестве регенерируемого компонента принимает участие аминокислота *орнитин* (138), которая не относится к числу аминокислот, формирующих белки, но является важным компонентом азотного обмена. Цикл состоит из следующих четырех реакций:

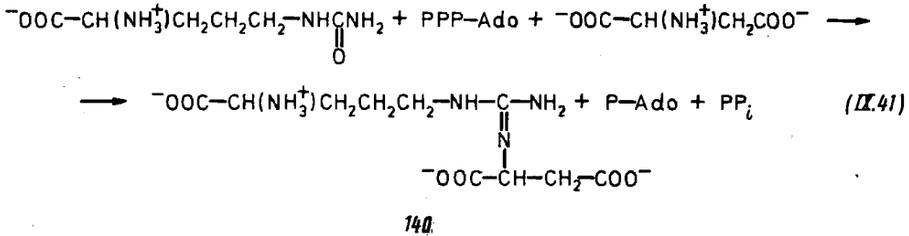
1) перенос карбамоильного остатка от карбамоилфосфата на *δ*-аминогруппу орнитина с образованием аминокислоты *цитруллина* (139)



(IX.40)

который катализируется ферментом *орнитин карбамоилтрансферазой*;

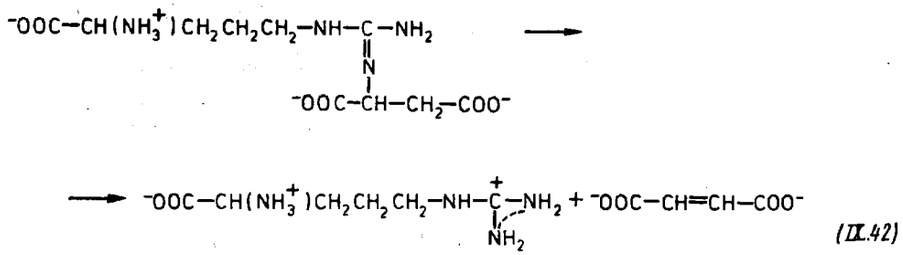
2) взаимодействие цитруллина с аспартатом с образованием аргининосукцината (140), сопряженным с гидролизом АТФ до АМФ и пирофосфата



(IX.41)

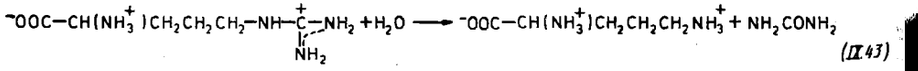
которое проходит с участием фермента *аргининосукцинат синтетазы*;

3) отщепление фумарата от аргининосукцината, катализируемое *аргининосукцинат лиазой* и приводящее к образованию аргинина:



(IX.42)

4) гидролиз аргинина с помощью фермента *аргиназы*, приводящий к отщеплению мочевины и регенерации орнитина:

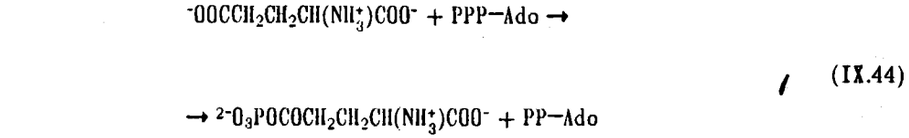


(IX.43)

Как и в случае цикла трикарбоновых кислот, некоторые из компонентов, функционирующих в цикле мочевины, могут расходоваться в других биохимических превращениях. Очевидно, например, что часть аргинина может использоваться в биосинтезе белков. Поэтому необходимо пополнение запасов компонентов цикла.

Основным путем является биосинтез орнитина из глутамата, который проходит в результате трехстадийного превращения:

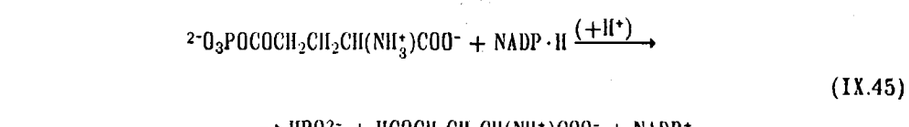
1) фосфорилирование γ-карбоксильной группы глутамата с образованием γ-глутамилфосфата



(IX.44)

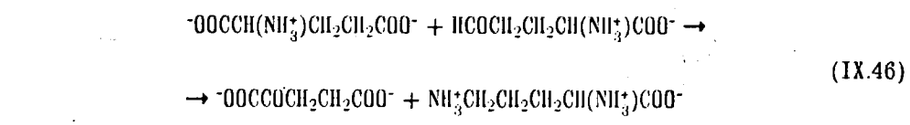
при участии фермента *глутамат киназы*;

2) восстановление γ-глутамилфосфата с помощью NADP·H при действии фермента *глутаматсемиальдегид дегидрогеназы*:



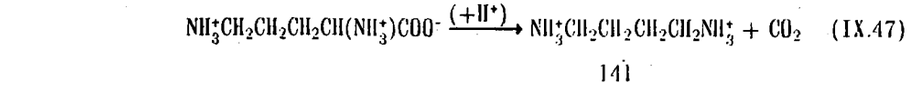
(IX.45)

3) переаминирование семиальдегида с глутаматом с образованием орнитина, катализируемое *орнитин аминотрансферазой*:



(IX.46)

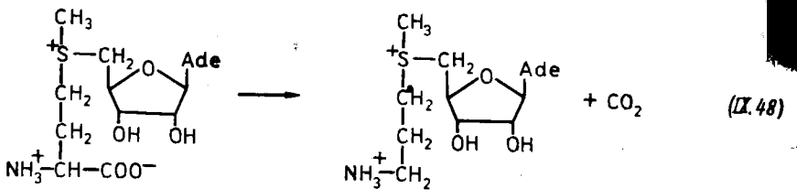
Помимо расходования аргинина из числа процессов, уводящих циклически работающие компоненты, следует упомянуть расходование орнитина на образование группы аминов, принимающих участие в нейтрализации отрицательных зарядов нуклеиновых кислот. Простейший из них — *путресцин* (141) — образуется путем декарбоксилирования орнитина при действии фермента *орнитин декарбоксилазы*:



(IX.47)

141

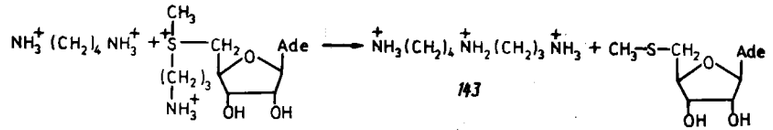
Путресцин может подвергаться алкилированию 3-аминопропильным остатком, донором которого служит 5′-дезокси-5′-аденозил(3-аминопропил)-метилсульфоний (142), образующийся при действии фермента *аденозилметионин декарбоксилазы* на S-аденозилметионин:



142

(IX.48)

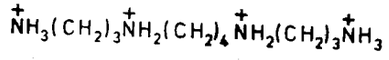
При взаимодействии этого алкилирующего реагента с путресцином, катализируемым *спермидин синтазой*, образуется *спермидин* (143):



143

(IX.49)

а при повторном действии того же реагента на спермидин при участии фермента *спермин синтазы* образуется *спермин* (144):



144

9.5. БИОСИНТЕЗ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Двадцать аминокислот, из которых на рибосомах формируются новые полипептидные цепи, т.е. создается весь набор свойственных данному живому организму белков, являются важнейшими компонентами всех живых организмов и должны поставляться в значительных количествах. Растения и большая часть микроорганизмов способны производить весь набор аминокислот и, следовательно, располагают набором всех ферментов, необходимых для их биосинтеза. У животных, аналогично тому, как это имеет место в случае коферментов и кофакторов, часть ферментов, необходимых для биосинтеза аминокислот из простых и доступных предшественников, отсутствует, в связи с чем некоторые аминокислоты должны быть получены ими с пищей. Такие аминокислоты называют *незаменимыми*. К их числу относят триптофан, фенилаланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, лизин, аргинин, гистидин и треонин. Строго говоря, к этой же категории следовало бы отнести цистеин и тирозин, поскольку пути их биосинтеза у этих организмов из доступных предшественников отсутствуют. Однако в продуктах питания их присутствие не столь обязательно, так как цистеин может легко образовываться из незаменимого метионина, а тирозин — из незаменимого фенилаланина. Аргинин является незаменимой аминокислотой лишь в период интенсивного роста организмов, когда он необходим в особенно больших количествах. Умеренные потребности в аргинине у животных могут обеспечиваться за счет функционирования цикла мочевины.

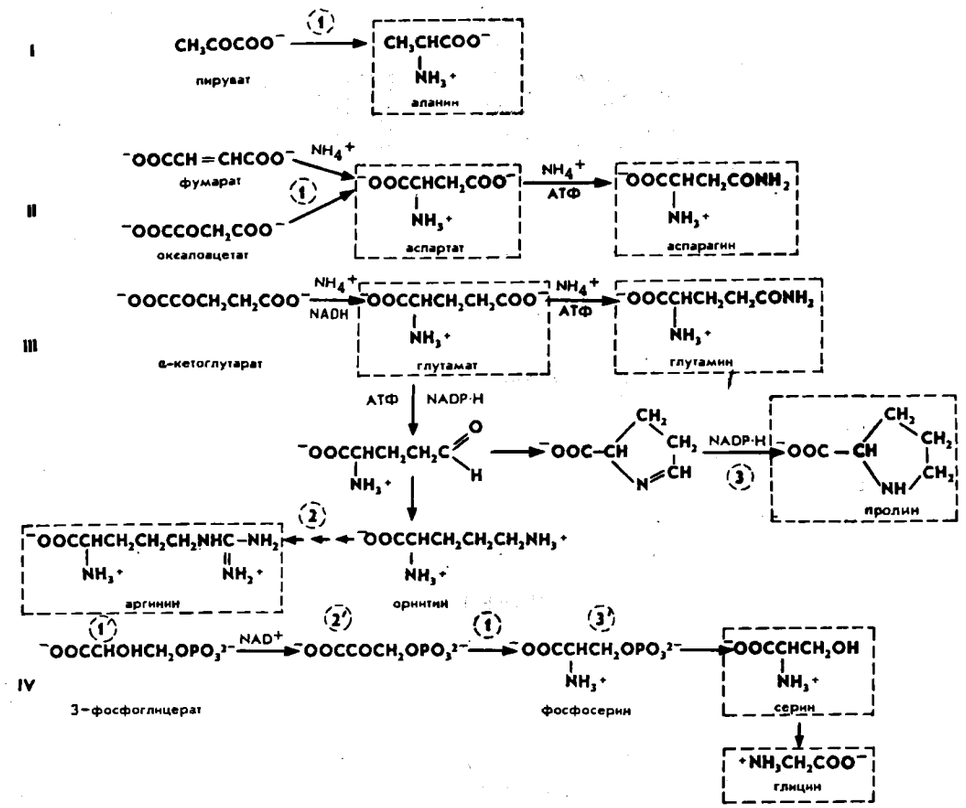


Рис. 110. Общая схема биосинтеза заменимых аминокислот:

1 — переаминирование с глутаматом; *2* — реакции цикла мочевины; *3* — восстановление пирролин-5-карбоксилата

Наряду с ферментами для биосинтеза аминокислот живые организмы располагают системами ферментов, обеспечивающими деструкцию аминокислот в биоэнергетических целях. Кроме того, многие аминокислоты наряду с их включением в состав белковых молекул необходимы для синтеза низкомолекулярных соединений небелковой природы. В связи с этим в данном параграфе рассматриваются три аспекта метаболизма аминокислот: пути их биосинтеза, пути их деструкции и некоторые важнейшие направления использования аминокислот для производства других низкомолекулярных компонентов живых организмов.

Отдельные аспекты биосинтеза заменимых аминокислот уже рассматривались в предыдущих разделах курса. Полностью заменимыми являются восемь аминокислот: аланин, аспартат, аспарагин, глутамат, глутамин, серин, глицин и пролин. Общая схема их синтеза представлена на рис. 110. Исходными, не содержащими азота, соединениями для них являются компоненты гликолитической цепи — пируват и 3-фосфоглицерат — и компоненты цикла трикарбоновых кислот — α-кетоглутарат, фумарат и оксалоацетат. Введение аминогруппы в глутамат и аспартат происходит в результате глутаматдегидрогеназной реакции (IX.37) или в

результате присоединения аммиака к фумарату по реакции (IX.38). Аспартат также может образовываться в результате переаминирования из оксалоацетата с использованием в качестве донора аминогруппы глутамата по реакции

$$^{-}OOC{-}COCH_2COO^{-} + {}^{-}OOC{-}CH(NH_3^{+})CH_2CH_2COO^{-} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons {}^{-}OOC{-}CH(NH_3^{+})CH_2COO^{-} + {}^{-}OOC{-}COCH_2CH_2COO^{-} \qquad (IX.50)$$

катализируемой *аспартат аминотрансферазой*.

Из глутамата и аспартата в реакциях, катализируемых соответственно глутамин синтетазой [см. реакцию (IX.36)] и *аспарагин синтетазой* по реакции

$$^{-}OOC{-}CH(NH_3^{+})CH_2COO^{-} + NH_4^{+} + PPP{-}Ado \rightarrow$$

$$\rightarrow {}^{-}OOC{-}CH(NH_3^{+})CH_2CONH_2 + P{-}Ado + PP_i \qquad (IX.51)$$

образуются глутамин и аспарагин.

Глутамат является также источником пролина, синтез которого осуществляется в цепочке реакций, представленной на рис. 110 и состоящей из ферментативного восстановления γ-карбоксильной группы глутамата с помощью NADP·H и при участии АТФ, последующей самопроизвольной циклизации образовавшегося семиальдегида до 5-пирролинкарбоновой кислоты и, наконец, восстановления пирролинового кольца до пирролидинового с помощью NADP·H, катализируемого *пирролин-5-карбоксилат редуктазой*.

Аланин образуется в реакции переаминирования из пирувата (см. § 4.2) с участием аланин аминотрансферазы.

Серин образуется из 3-фосфоглицерата в результате последовательного окисления 2-гидроксигруппы до кетогруппы с помощью NAD^{+}, катализируемого *фосфоглицерат дегидрогеназой* переаминирования образовавшегося 3-фосфогидроксипирувата с участием глутамата, катализируемого *фосфосерин аминотрансферазой*, и гидролиза образовавшегося *фосфосерина* с помощью *фосфосерин фосфатазы*. Из серина в результате переноса его гидроксиметильной группы на тетрагидрофолат по реакции (IV.10) образуется глицин.

Деструкция заменимых аминокислот в значительной мере проходит путем обращения пути их синтеза. Глутамат превращается в α-кетоглутарат под действием глутамат дегидрогеназы. Аспартат либо превращается в фумарат под действием аспартат аммиак-лиазы (см. § 9.4), либо в оксалоацетат путем переаминирования с глутаматом. Глутамин и аспарагин предварительно гидролизуются до соответствующих дикарбоновых кислот под действием соответственно *глутаминазы* и *аспарагиназы*. Пролин превращается в глутамат по цепочке реакций, представляющей собой обращение пути его биосинтеза. Аргинин гидролизуется до орнитина, а последний также превращается в глутамат по обращенной цепочке реакций биосинтеза орнитина. Аланин путем переаминирования с α-кетоглутаратом образует пируват. В § 9.7 все эти процессы будут суммированы в общей схеме пополнения компонентов цикла трикарбоновых кислот и запасов пирувата в результате деградации заменимых и незаменимых аминокислот.

Серин деградирует через промежуточное образование глицина, который в реакции переаминирования, катализируемой *глицин аминотрансферазой*

$$NH_3^{+}CH_2COO^{-} + {}^{-}OOC{-}COCH_2CH_2COO^{-} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons HCO{-}COO^{-} + {}^{-}OOC{-}CH(NH_3^{+})CH_2CH_2COO^{-} \qquad (IX.52)$$

превращается в глиоксилат. Последний может окисляться с помощью NAD^{+}, превращаясь в оксалилкофермент А по реакции

$$HCO{-}COO^{-} + Co{-}SH + NAD^{+} \rightleftharpoons CoA{-}SCO{-}COO^{-} + NAD\cdot H \qquad (IX.53)$$

катализируемой *глиоксилат дегидрогеназой (ацилирующей)*. Декарбоксилирование, катализируемое *оксалилкофермент А декарбоксилазой*, приводит к формильному производному кофермента А, а действие фермента *формилкофермент А гидролазы* переводит последнее в формиат. Он, в свою очередь, может соединяться с тетрагидрофолатом при действии *формилтетрагидрофолат синтетазы* по реакции

$$HCOO^{-} + THF + PPP{-}Ado \rightarrow HCO{-}THF + PP{-}Ado + HPO_4^{2-} \qquad (IX.54)$$

в результате чего пополняется запас одноуглеродных фрагментов.

Из синтетических процессов, протекающих с участием заменимых аминокислот, в первую очередь следует упомянуть роль глутамата и γ-NH_2-группы глутамина в качестве доноров аминогрупп. Аспартат также используется в качестве донора атомов азота, как видно на примере реакции (IX.41).

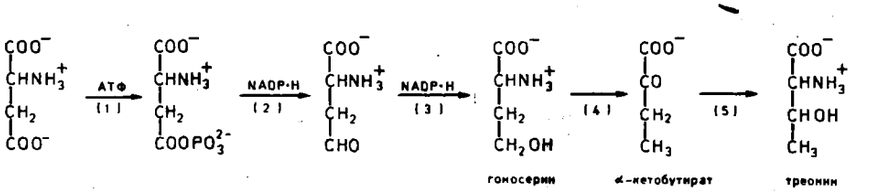
Кроме того, он участвует в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов (см. § 9.6) и некоторых незаменимых аминокислот (см. ниже).

Серин, как уже говорилось в § 4.2, является донором одноуглеродных фрагментов, необходимых для синтеза некоторых специальных систем, в частности пуриновых нуклеотидов (см. § 9.6), и для пополнения запасов S-аденозилметионина — главного источника метильных радикалов для многочисленных реакций метилирования. Кроме того, серин входит в состав фосфатидилсерина и является структурным элементом двух важнейших фосфолипидов — фосфатидилэтаноламина и лецитина (см. § 9.2).

Глицин используется в качестве строительного блока при синтезе пуриновых колец (см. § 9.6). Кроме того, он является одним из участников биосинтеза такой чрезвычайно важной структуры, как порфириновая. На рис. 111 приведена схема биосинтеза важнейшего порфирина — протопорфирина IX, непосредственного предшественника гема (1, § 1.1) и предшественника хлорофилла (122, § 8.7).

Незаменимые аминокислоты синтезируются и деградируют в живых организмах уникальными многостадийными путями. В большинстве случаев, как будет видно из последующего изложения, исходными веществами являются компоненты гликолитической цепи и цикла трикарбоновых кислот. Они же образуются при деградации аминокислот.

Биосинтез треонина проходит по следующей схеме:



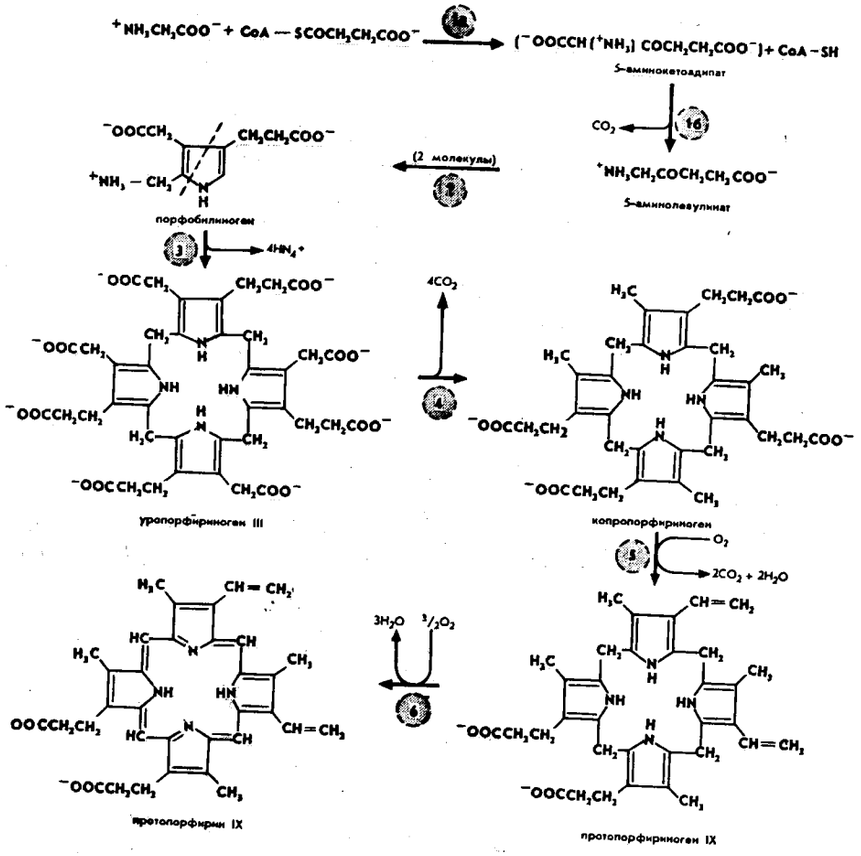
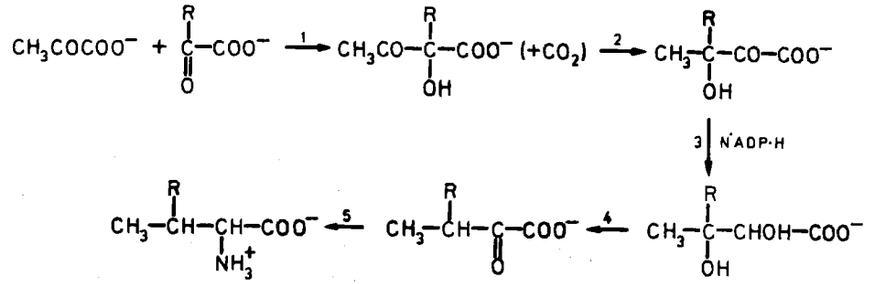


Рис. 111. Схема биосинтеза протопорфирина IX

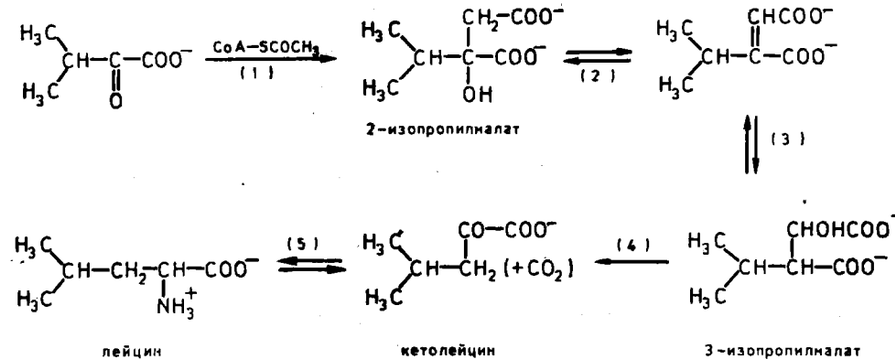
Ферменты, катализирующие отдельные стадии цепи, приведены в приложении в таблице ферментов. В структуре порфобилиногена штриховой линией разделены половины молекул, полученные из разных молекул 5-аминолевулината. Уропорфириноген III образуется при участии дополнительного белка косинтазы

Как следует из этой схемы и из предыдущего изложения, его углеродный скелет происходит из фумарата или оксалоацетата, являющихся непосредственными предшественниками аспартата. Сначала в три стадии происходит восстановление β-карбоксильной группы аспартата до гидроксигруппы, приводящее к образованию гомолога серина — *гомосерина*. Затем в две стадии происходит изомеризация гомосерина в треонин с промежуточным образованием α-кетобутирата. Обе стадии представляют собой обратимые реакции гидратации — дегидратации переходящих друг в друга гидроксиаминокислот, причем в обоих случаях дегидратация сопровождается заменой аминогруппы на кетогруппу и катализируется ферментами, содержащими в качестве кофактора пиридоксальфосфат, — *гомосерин дегидратазой* и *треонин дегидратазой*. α-Кетобутират является одновременно исходным соединением для биосинтеза изолейцина. Валин и изолейцин образуются по идентичной схеме:



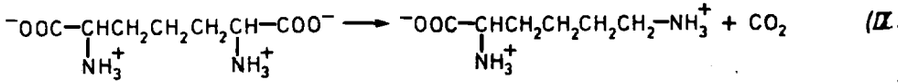
Все ферменты, катализирующие отдельные стадии этих процессов, являются общими для биосинтеза обеих аминокислот с разветвленной углеродной цепью. Процесс в случае биосинтеза валина начинается с соединения двух молекул пирувата, а в случае биосинтеза изолейцина — с соединения пирувата и α-кетобутирата. Сначала в несколько стадий образуются соответствующие α-кетокислоты, а на заключительном этапе происходит их переаминирование с глутаматом, приводящее к аминокислотам.

Непосредственный предшественник валина α-кетоизовалерат одновременно является предшественником лейцина. Биосинтез лейцина идет по следующей схеме:



На первой стадии с участием фермента *2-изопропилмалат синтазы* происходит присоединение ацетильного остатка ацетилкофермента А к α-кетогруппе кетоизовалерата с образованием 2-изопропилмалата, который в две стадии превращается в непосредственный предшественник лейцина — кетолейцин. Переаминирование последнего с глутаматом, приводящее к образованию лейцина, проходит с участием того же фермента, который катализирует реакцию переаминирования при биосинтезе валина и изолейцина — *аминотрансферазы разветвленных аминокислот*.

Лизин у бактерий и фотосинтезирующих растений образуется в результате декарбоксилирования мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты, катализируемого *диаминопимелинат декарбоксилазой*:



(IX.55)

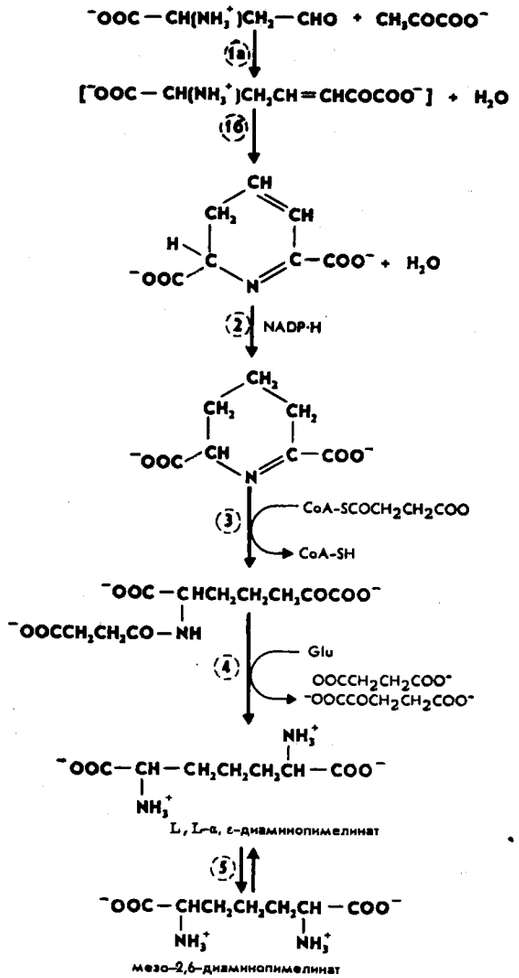


Рис. 112. Биосинтез мезо-2,6-диаминопимелината. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

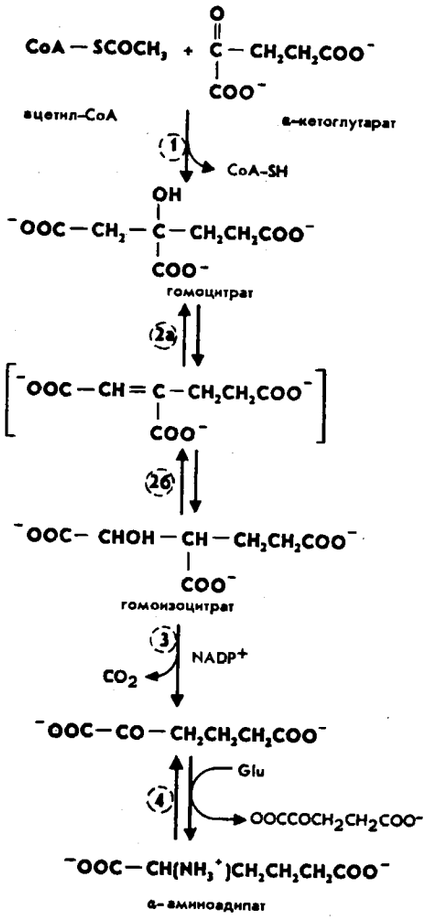


Рис. 113. Схема биосинтеза α-аминоадипата. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

Схема биосинтеза диаминопимелината представлена на рис. 112. Процесс начинается с взаимодействия пирувата и аспартат β-семиальдегида, т.е. углеродный скелет лизина образуется из пирувата и фумарата или оксалоацетата. На одной из промежуточных стадий в процессе в качестве донора сукцинильного остатка принимает участие еще один компонент цикла трикарбоновых кислот — сукцинилкофермент А, однако на следующей же стадии сукцинильный остаток от промежуточного сукцинилдиаминопимелината отщепляется и в состав конечного продукта не входит.

Известен второй путь биосинтеза лизина, реализуемый у грибов и плесеней. Углеродный скелет лизина по этому пути формируется из ацетильного фрагмент

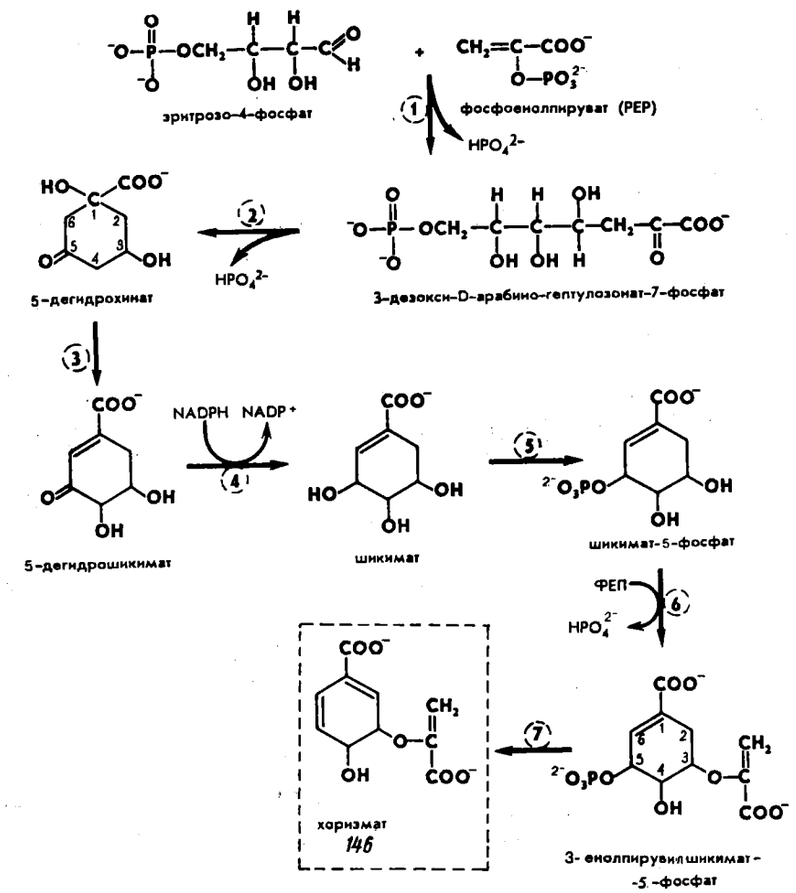
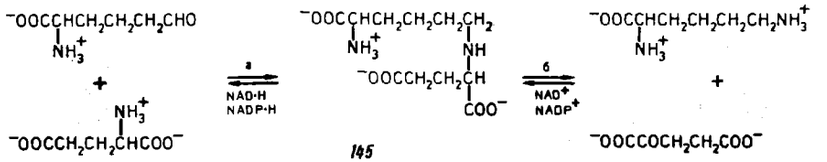


Рис. 114. Схема биосинтеза хоризмата. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

ацетилкофермента А и α-кетоглутарата, которые образуют гомолог цитрата гомоцитрат, далее в три стадии переходящий в α-аминоадипат. Схема его биосинтеза приведена на рис. 113. α-Аминоадипат далее восстанавливается до δ-семиальдегида и затем с участием глутамата и NAD·H или NADP·H в качестве восстановителя из него образуется N6-(L-1.3-дикарбоксипропил)-L-лизин (*сахаропин*) (145). Эта реакция катализируется *сахаропин дегидрогеназой*, образующей глутамат. На следующей стадии при участии другого фермента — *сахаропин дегидрогеназы, образующей лизин* при участии NAD+ или NADP+, в качестве окислителя сахаропин превращается в L-лизин и α-кетоглутарат:



(IX.56)

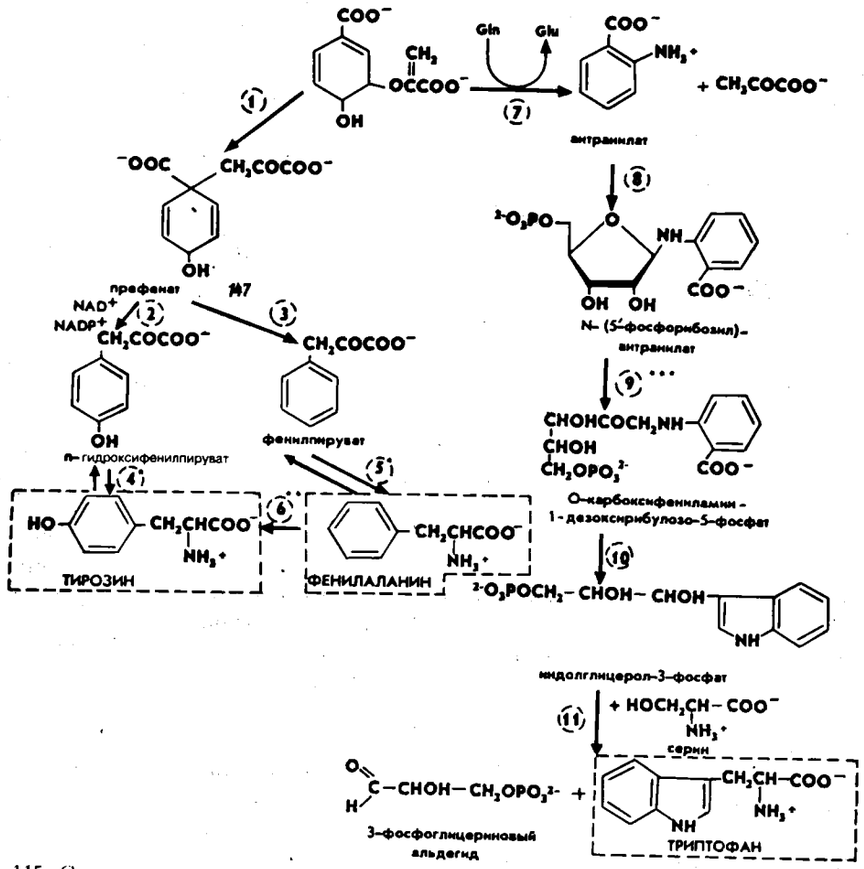


Рис. 115. Схема превращений хоризмата в ароматические аминокислоты (названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении):

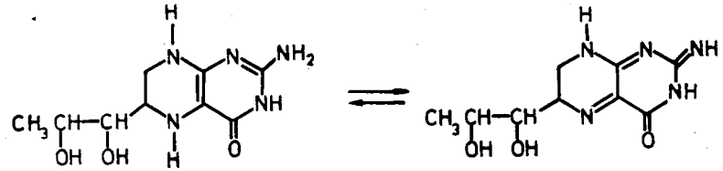
*переаминирование с L-глутаматом; **фенилаланин гидроксилаза катализирует окисление фенилаланина сопряженно с окислением тетрагидробиотерина; ***фермент, катализирующий стадию (9), в таблице ферментов отсутствует

Ароматические аминокислоты — фенилаланин, тирозин и триптофан — синтезируются из общего предшественника *хоризмата* (146), биосинтез которого представлен на рис. 114. Процесс начинается с реакции конденсации фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата — промежуточного продукта взаимопревращений гексоз и пентоз (см. § 9.1). Образовавшийся 3-дезокси-*D*-арабино-гептулозонат-7-фосфат претерпевает реакцию циклизации, приводящую к дегидрохинату, который далее в несколько стадий дает хоризмат.

Схема превращений хоризмата в ароматические аминокислоты приведена на рис. 115. Биосинтез фенилаланина и тирозина имеет общую стадию — образование *префената* (147), катализируемое *хоризмат мутазой*. Из префената образуются кетокислоты, соответствующие фенилаланину и тирозину, которые превращаются в аминокислоты путем реакции переаминирования. У млекопитающих, в том числе у человека, в печени присутствует фермент *фенилаланин гидроксилаза*,

катализирующая окисление фенилаланина до тирозина молекулярным кислородом.

Фермент представляет собой монооксигеназу, причем в качестве вспомогательного донора участвует *тетрагидробиоптерин* (148 а), который при этом окисляется в *дигидробиоптерин* (148 б):



148 а 148 б

Регенерация 148 б происходит путем восстановления NADP·H.

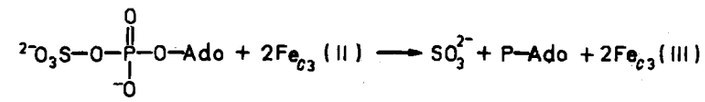
Биосинтез триптофана начинается с образования антранилата, причем донором аминогруппы является NH_2-группа глутамина. На последней стадии, катализируемой ферментом *триптофан синтазой*, происходит перенос индольного гетероцикла от глицерин фосфата на атом C при гидроксигруппе серина, сопровождающейся отщеплением гидроксигруппы серина в виде молекулы воды и превращением гидроксигруппы остатка глицеринфосфата в альдегидную.

Биосинтез гистидина тесно связан с биосинтезом пуриновых нуклеотидов и его предшественники наиболее далеко отстоят от продуктов центральных метаболических путей — гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Исходными молекулами являются АТФ и один из предшественников нуклеотидов — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат. Биосинтез обоих веществ рассматривается в следующем параграфе. Схема биосинтеза гистидина приведена на рис. 116. Видно, что в состав гистидина входит углеродный остов 5-фосфорибозилпирофосфата, причем два из его пяти атомов C входят в состав нового имидазольного цикла, который формируется с участием двухатомного фрагмента C—N пиримидиновой части аденина и атома азота NH_2-группы глутамина. Имидазольная часть аденина на одной из стадий освобождается в виде 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибозофосфата, промежуточного соединения в биосинтезе пуриновых нуклеотидов.

Две аминокислоты — цистеин и метионин — содержат серу. Основным источником серы в природе, используемым для построения содержащих серу соединений, являются сульфаты. У бактерий, грибов и растений существует механизм восстановления сульфатов до сульфидов, из которых и образуются серосодержащие аминокислоты. Первой стадией этого процесса является образование аденилилсульфата, происходящее по реакции

$$PPP\text{—}Ado + SO_4^{2-} \rightarrow PP_i + {}^{2-}O_3SO\text{—}\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}\text{—}O\text{—}Ado \qquad (IX.57)$$

и катализируемое *сульфат аденилилтрансферазой*. Это соединение может восстанавливаться до сульфита, причем восстановителем является ферроцитохром a_3 (Fe_{c3}) — гемопротеид, имеющий молекулярную массу около 13 000 и несущий четыре остатка гема. Процесс описывается уравнением



(IX. 58)

и катализируется *аденилилсульфат редуктазой*. Наряду с реакцией (IX. 58) известен другой путь образования сульфита, которому предшествует фосфорилирование 3-гидроксигруппы аденилилсульфата с образованием 3-фосфоаденилилсульфата:

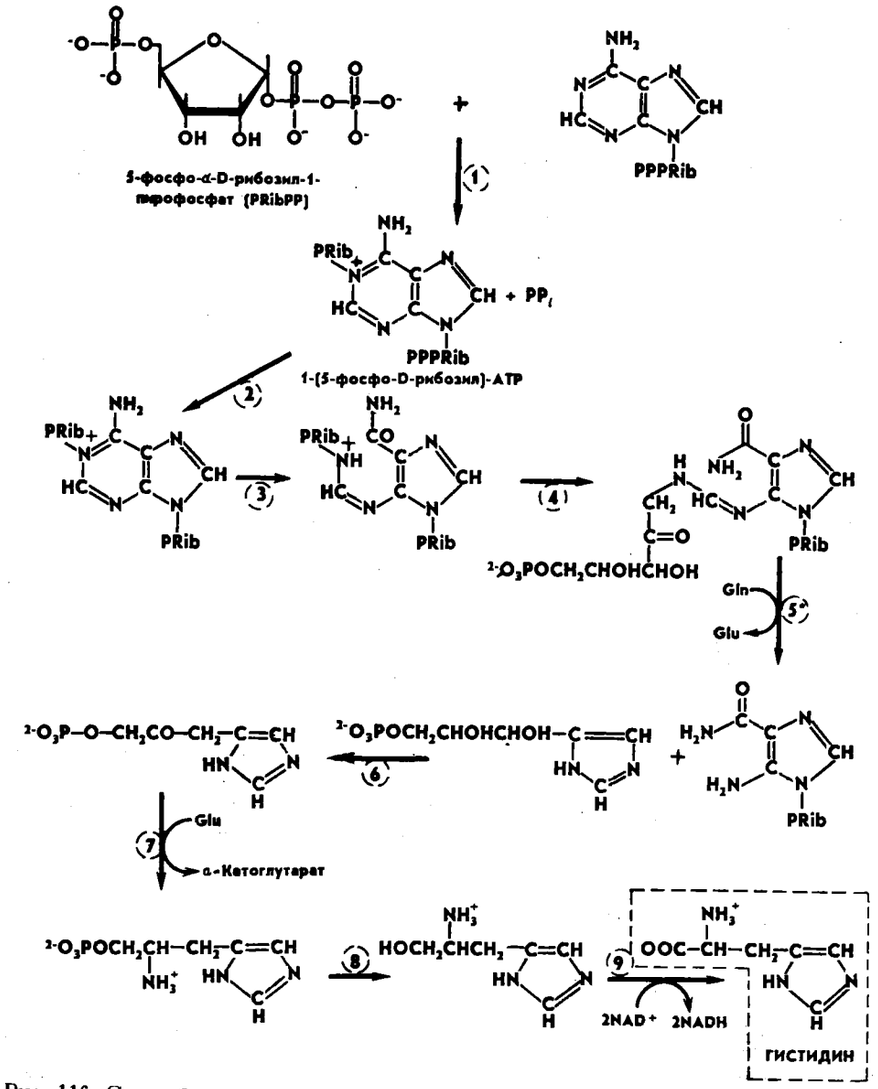
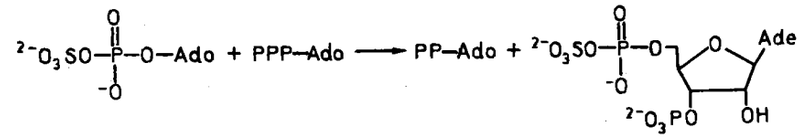


Рис. 116. Схема биосинтеза гистидина. Названия ферментов, катализирующих стадии (4) и (5), в таблице ферментов отсутствуют

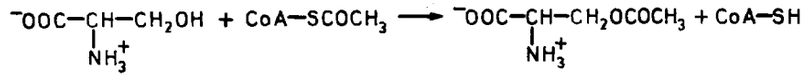


(IX. 59)

Процесс катализируется *аденилилсульфат киназой*. У *E.coli* существует механизм восстановления этого соединения до сульфита с помощью NADP·H. Это же соединение является донором сульфата в сульфотрансферазных реакциях, в ходе которых происходит образование сульфоэфирных групп, в том числе у таких полисахаридов, как гепарин и хондроитинсульфат. Сульфит-ион восстанавливается до сульфида с помощью NADP·H по реакции, катализируемой *сульфитредуктазой*:

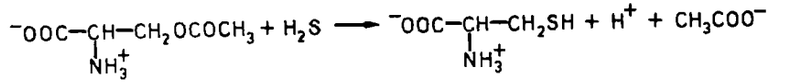
$$SO_3^{2-} + 3NADP\cdot H + 5H^+ \rightarrow H_2S + 3NADP^+ + 3H_2O \qquad (IX.60)$$

Углеродный скелет цистеина происходит от серина, который сначала ацетилируется по гидроксигруппе по реакции



(IX. 61)

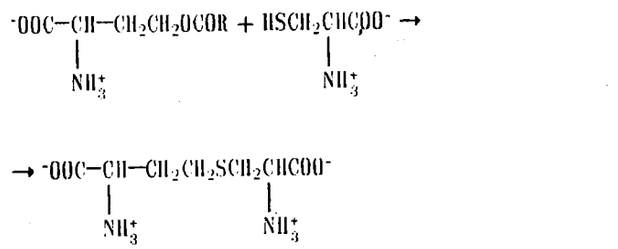
при участии *серин ацетилтрансферазы* и затем взаимодействует с H_2S с образованием цистеина и освобождением ацетата:



(IX. 62)

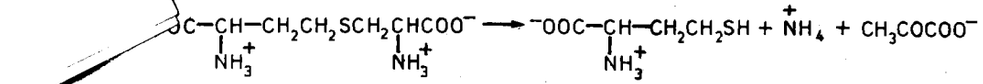
Фермент, катализирующий это превращение, называется *цистеин синтазой*.

Метионин образуется из гомолога цистеина — *гомоцистеина* — в результате метилирования последнего N5-метилтетрагидрофолатом (см. § 4.2). Образование гомоцистеина происходит с участием цистеина и гомосерина, биосинтез которого описан схемой, приведенной в этом параграфе. Гомосерин ацилируется с помощью *гомосерин ацетилтрансферазы* или *гомосерин сукцинилтрансферазы* с использованием в качестве донора ацильного остатка соответствующих производных кофермента А в реакциях, аналогичных (IX. 61). Далее по реакции с цистеином



(IX.63)

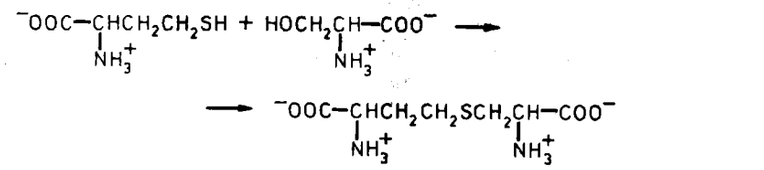
(здесь R=CH_3, $CH_2CH_2COO^-$) образуется диаминодикарбоновая кислота — цистатионин (149), играющая ключевую роль в метаболизме серосодержащих аминокислот. Процессы катализируются *О-ацетил-* и *О-сукцинилгомосерин* (тиол) *лиазами*. В результате процесса



(IX.64)

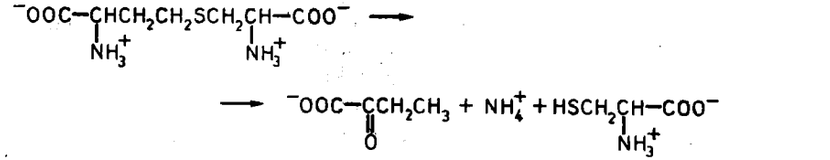
катализируемого *цистатионин-β-лиазой*, образуется гомоцистеин.

У животных, как уже говорилось в начале параграфа, цистеин и метионин являются незаменимыми аминокислотами и должны содержаться в достаточном количестве в продуктах питания. Существует, однако, путь превращения метионина в цистеин, который при не слишком интенсивном росте организма может обеспечить потребности организма животного в цистеине за счет метионина. Как уже говорилось в § 4.2, метионин используется в живых организмах как источник S-аденозилметионина — основного метилирующего реагента. Последний образуется по реакции (IV.14), катализируемой метионин аденозилтрансферазой. После использования его в качестве донора метильной группы в одном из многочисленных процессов метилирования остается S-аденозилгомоцистеин, который гидролизуется *аденозилгомоцистеиназой* до аденозина и гомоцистеина, а последний по реакции (IV.13) снова даст метионин. Однако часть гомоцистеина может вступить во взаимодействие с серином по реакции



(IX.65)

катализируемой *цистатионин-β-синтазой* с образованием цистатионина. Последний может гидролизоваться при действии фермента *цистатионин γ-лиазы* по реакции

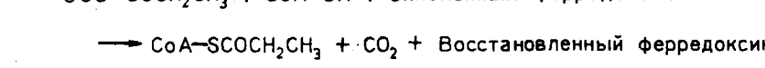


(IX.66)

приводящей к образованию цистеина и α-кетобутирата.

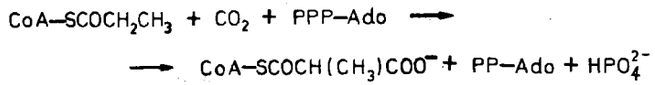
Окислительная деструкция незаменимых аминокислот также проходит достаточно разнообразными путями. Обращение биосинтетического пути при этом используется существенно реже, чем в случае заменимых аминокислот. Как правило, деструкция начинается с превращения их в соответствующие α-кетокислоты путем переаминирования.

В случае треонина процесс начинается с дезаминирования треонина с образованием α-кетобутирата в результате действия треонин дегидратазы. За этим следует окислительное декарбоксилирование α-кетобутирата. Его продуктом, как и во многих других случаях окислительного декарбоксилирования, является образование соответствующего ацилкофермента А — в данном случае пропионилкофермента А. Однако процесс идет, в отличие от превращений пирувата и сукцината, с участием ферредоксина в качестве восстановителя, без участия тиаминпирофосфата и липоамида по суммарной реакции



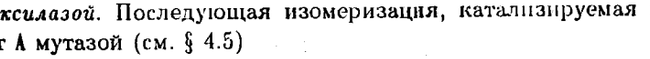
(IX.67)

катализируемой *2-кетобутират синтазой*. За этой реакцией следует карбоксилирование среднего атома пропионального фрагмента с образованием метилмалонилкофермента А:



(IX.68)

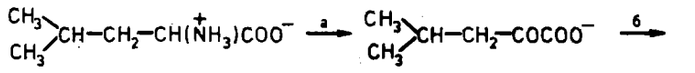
Процесс катализируется содержащим биотин ферментом — *пропионилкофермент А карбоксилазой*. Последующая изомеризация, катализируемая метилмалонилкофермент А мутазой (см. § 4.5)



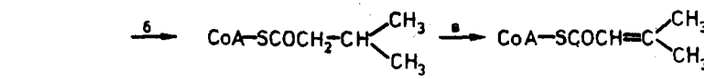
(IX.69)

приводит к сукцинилкоферменту А — одному из компонентов цикла трикарбоновых кислот.

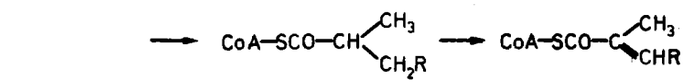
Окислительная деструкция аминокислот с разветвленным углеродным скелетом — валина, изолейцина и лейцина — начинается с трех практически идентичных для этих аминокислот превращений. Первое представляет собой переаминирование с α-кетоглутаратом, катализируемое уже упоминавшейся трансаминазой разветвленных аминокислот. Второе, по-видимому, протекающее в несколько стадий превращение — окислительное декарбоксилирование образовавшихся α-кетокислот, завершающееся переносом ацильного остатка на кофермент А. *Дегидрогеназа разветвленных* α-кетокислот функционирует по механизму, описанному для окисления пирувата и α-кетоглутарата в § 4.1, с участием тиаминпирофосфата в качестве кофактора фермента и липоамида в качестве промежуточного акцептора ацильного остатка. Далее происходит дегидрирование C_β—C_γ-фрагмента, катализируемое в случае деструкции лейцина *изовалерилкофермент А дегидрогеназой*, а в случае деструкции валина и изолейцина *2-метилацилкофермент А дегидрогеназой*. С участием переносящего электроны флавопротеида эти ферменты могут поставлять электроны убихинону в цепь переноса электронов:



(IX.70)



(IX.71)



(R = H — валин, R = CH_3 — изолейцин).

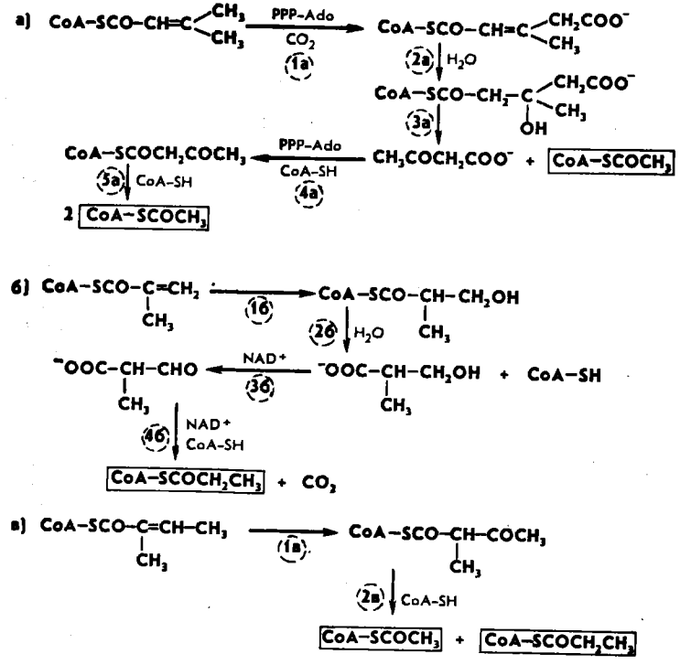


Рис. 117. Схема деструкции ацильных производных кофермента А – промежуточных соединений деградации лейцина (*а*), валина (*б*), изолейцина (*в*). Названия ферментов, участвующих в деструкции, приведены в приложении

Дальнейшие превращения для трех рассматриваемых аминокислот существенно различаются. Наиболее детально изучены превращения 3-метилкротонилкофермента А — продукта частичной деструкции лейцина (рис. 117, *а*). Конечными продуктами являются три молекулы ацетилкофермента А, поступающие в цикл трикарбоновых кислот. 2-Метилакрилилкофермент А, образующийся из валина, гидратируется до 3-гидроксиизобутирилкофермента А и затем с помощью 3-гидроксиизобутирилкофермент А гидролазы переходит в 3-гидроксиизобутират (рис. 117, *б*). Гидроксигруппа последнего окисляется до альдегидной NAD^+ при участии *3-гидроксиизобутират дегидрогеназы* с образованием метилмалонового семиальдегида. Окисление последнего NAD^+, сопровождающееся декарбоксилированием и переносом ацильного остатка на кофермент А, приводит к образованию пропионилкофермента А. Процесс катализируется *дегидрогеназой метилмалонового семиальдегида*. Превращение пропионилкофермента А в компонент цикла трикарбоновых кислот сукцинилкофермент А описано несколько выше в связи с рассмотрением пути окислительной деструкции треонина. 2-Метилкротонилкофермент А (рис. 117, *в*), образующийся из изолейцина, скорее всего в две стадии — путем гидратации и окисления — превращается в 2-метилкетобутирилкофермент А, который далее реагирует с еще одной молекулой CoA-SH с переносом ацетильного остатка, что приводит к одной молекуле ацетилкофермента А и одной молекуле пропионилкофермента А.

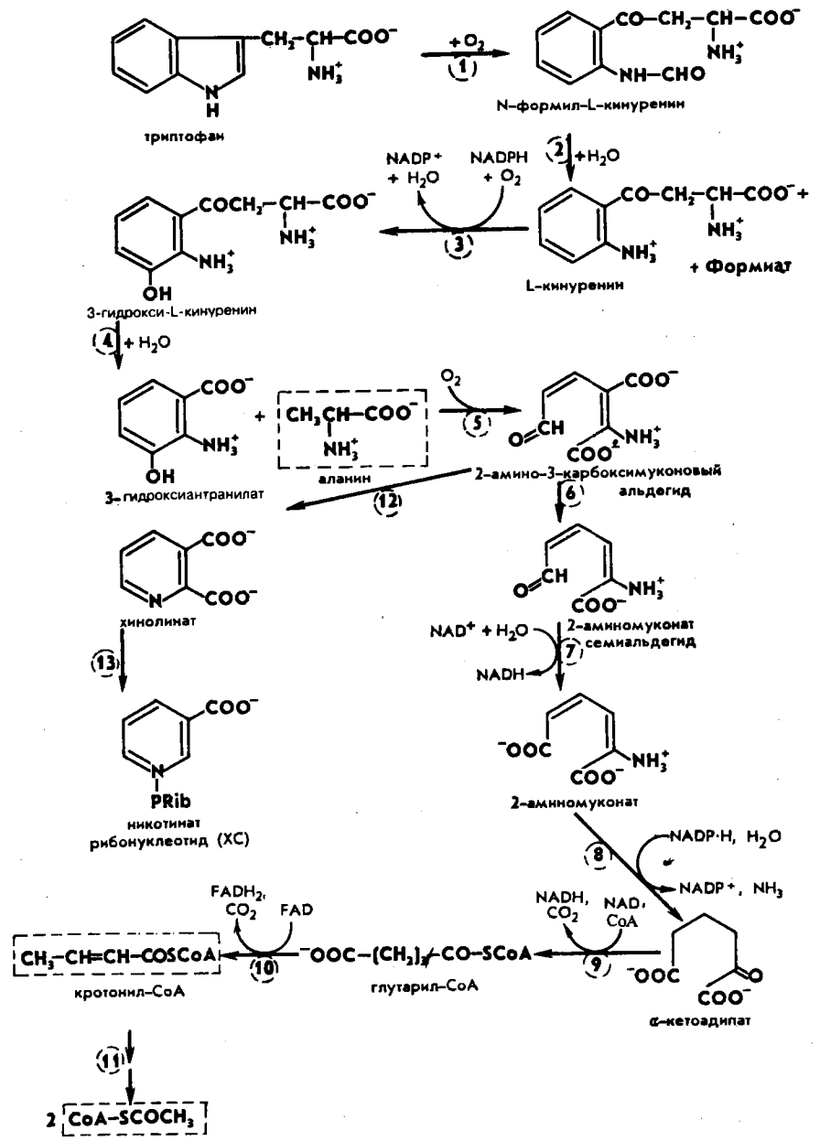


Рис. 118. Схема катаболизма триптофана. Названия ферментов, участвующих в процессе катаболизма, приведены в приложении

Отличительной чертой окислительной деструкции ароматических аминокислот является участие в ряде стадий молекулярного кислорода. На рис. 118 представлена схема превращений триптофана. Процесс начинается с разрушения пиррольного фрагмента индола путем окисления триптофана до N-формилкинуренина. Процесс катализируется триптофан 2,3-диоксигеназой (см. § 4.1). После превращения N-формилкинуренина в 3-гидрокси-L-кинуренин происходит гидроли-

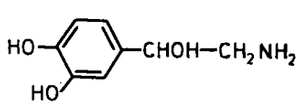
тическое отщепление аланина и образование 3-гидроксиантранилата. Последний подвергается еще одной диоксигеназной реакции, приводящей к разрушению бензольного кольца с образованием *3-карбоксимуконатсемиальдегида*. Последующая цепочка превращений приводит в конечном итоге к глутарилкоферменту А, который в результате окислительного декарбоксилирования даст кротонилкофермент А. Это соединение является одним из промежуточных веществ, завершающих окислительную деструкцию жирных кислот с образованием двух молекул ацетилкофермента А. Таким образом, из одиннадцати углеродных атомов триптофана в результате окислительной деструкции один переходит в формиат, три в CO_2, три — в молекулу аланина и далее в пируват и четыре — в два ацетильных остатка $CoA{-}SCOCH_3$.

2-Амино-3-карбоксимуконатсемиальдегид частично может претерпевать внутримолекулярную реакцию образования шиффова основания, что приводит к циклизации с образованием *хиполината*. Последний является предшественником никотинамидного фрагмента NAD^+ и $NADP^+$. Схема превращений также приведена на рис. 119.

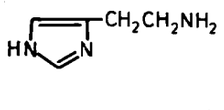
Окислительная деструкция фенилаланина и тирозина начинается после их превращения в *п*-гидроксифенилпируват. Две следующие одна за другой диоксигеназные реакции (рис. 119) приводят к декарбоксилированию боковой цепи и разрушению ароматического кольца с образованием 4-малеилацетоацетата. Последующая цепочка превращений приводит в конечном итоге к молекуле фумарата и трем молекулам $CoA{-}SCOCH_3$. Таким образом, девять углеродных атомов фенилаланина и тирозина переходят в состав фумарата (4 атома С), три ацетильных фрагмента ацетилкофермента А (6 атомов) и одной молекулы CO_2.

На рис. 120 представлены первые этапы деструкции гистидина. Как видно из приведенной схемы, два соседних атома С имидазольного цикла и все три атома боковой цепи входят в конечном итоге в состав молекулы глутамата, а один атом С — в состав метенилтетрагидрофолата, т.е. становится одноуглеродным фрагментом.

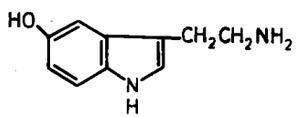
Все аминокислоты, содержащие ароматические или гетероциклические фрагменты, являются предшественниками гормонов и других важных биологических регуляторов, производимых высшими организмами. Фенилаланин и тирозин являются предшественниками адреналина (48) и норадреналина (150), гистидин — предшественником гистамина (151) — триптофан — предшественником серотонина (152). Пути превращения аминокислот, приводящие к этим соединениям, достаточно очевидны и читателю предоставляется возможность самому написать эти превращения и определить, какими ферментами они должны катализироваться:



150



151



152

Для лизина известно несколько путей окислительной деструкции. У млекопитающих преобладает путь, который вплоть до стадии образования *α*-кетоадипата является обращением процесса (IX.56) биосинтеза лизина через *α*-аминоадипат с

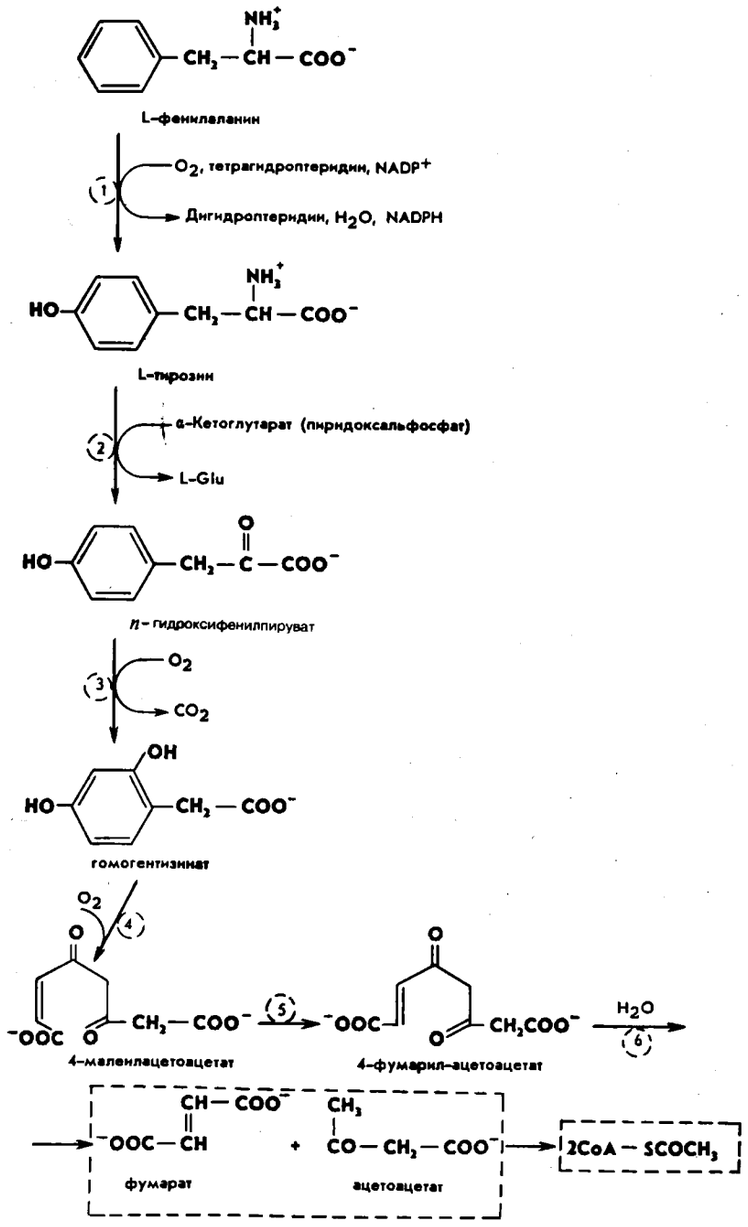


Рис. 119. Схема окислительной деструкции фенилаланина и тирозина. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

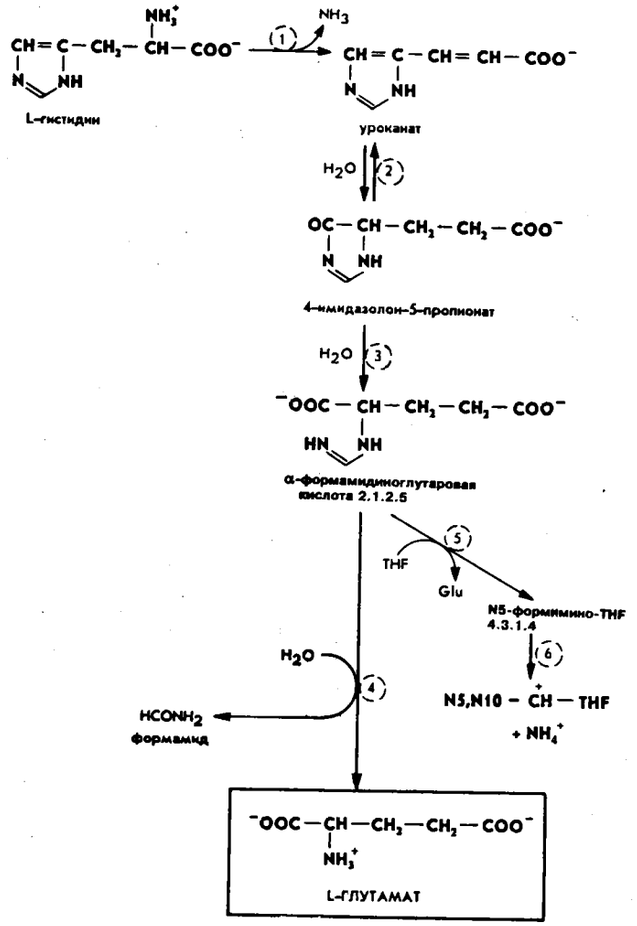
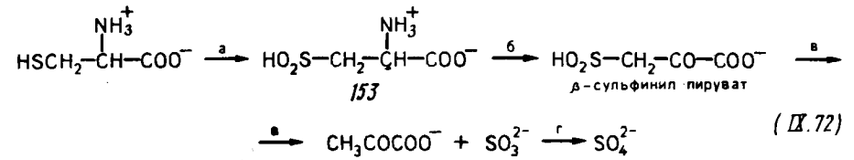


Рис. 120. Схема катаболизма гистидина. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

последующим переаминированием. Окислительное декарбоксилирование α-кето адипата приводит к глутарилкоферменту А, как это происходит на заключительном этапе окислительной деструкции триптофана (см. рис. 118). Следовательно, углеродный скелет лизина на этом пути превращается в две молекулы CO_2 и два ацетильных фрагмента $CoA{-}SCOCH_3$.

Метионин претерпевает окислительную деструкцию после превращения в гомосерин по пути, описанному для превращения метионина в цистеин. Гомосерин переходит в α-кетобутират, который уже рассмотрен в связи с деструкцией треонина. Цистеин претерпевает превращения, завершающиеся образованием пирувата и сульфат-иона. Образующаяся на первой стадии, катализируемой *цистеиндиоксигеназой*, цистеинсульфиновая кислота (153), кроме того, является предшественником некоторых важных серосодержащих соединений. В частности

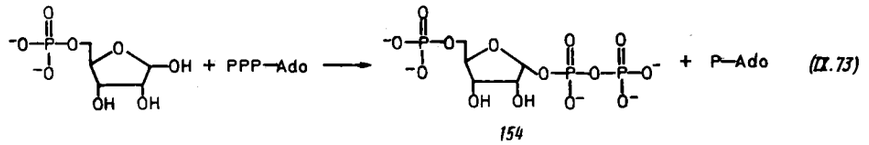


(IX.72)

она может декарбоксилироваться под действием фермента цистеинсульфинат декарбоксилазы с образованием гипотаурина, который, в свою очередь, с помощью NAD^+ под действием фермента гипотаурин дегидрогеназы окисляется до *таурина* — компонента одной из желчных кислот, таурохолевой (76).

9.6. БИОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

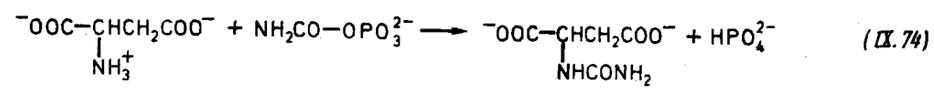
Предшественником рибозофосфатного фрагмента нуклеотидов является уже упоминавшийся в предыдущем параграфе *5-фосфорибозил-1-α-пирофосфат*, который образуется из рибозо-5-фосфата в результате переноса пирофосфатной группы от АТФ на его 1-гидроксигруппу, катализируемого *рибозофосфат пирофосфокиназой*:



(IX.73)

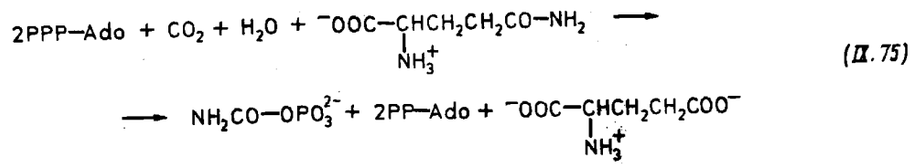
В дальнейшем на схемах в этом параграфе (154) будет сокращенно обозначаться как PRibPP, а его рибозофосфатный фрагмент — как PRib.

Биосинтез пиримидинового гетероцикла происходит вне связи с рибозофосфатом в реакции аспартата с карбамоилфосфатом



(IX.74)

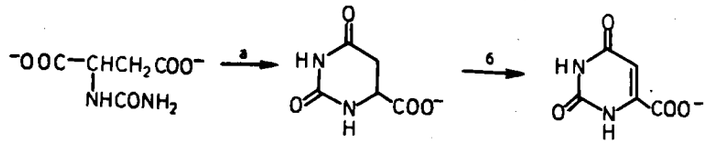
катализируемой *аспартат карбамоилтрансферазой*. Карбамоилфосфат для целей биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов синтезируется у эукариот в цитоплазме и донором аминогруппы служит глутамин. Процесс катализируется *карбамоилфосфат синтетазой (гидролизующей глутамин)*:



(IX.75)

Этот фермент отличается от находящегося в митохондриях и участвующего в первой, подготовительной, стадии цикла мочевины фермента, использующего для той же цели ионы аммония (см. § 9.4).

Карбамоиласпартат при действии фермента *дигидрооротазы* циклизуется с образованием дигидрооротата, который затем окисляется NAD^+ или $NADP^+$ до *оротата* (155):

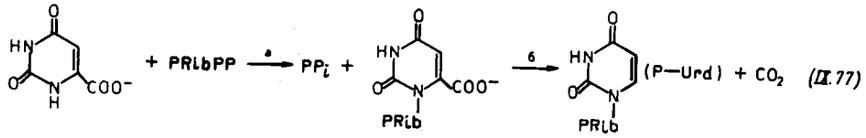


(IX.76)

155

Катализатором процесса является соответствующая *оротат редуктаза.*

Следующая стадия, катализируемая *оротат фосфорибозилтрансферазой*, приводит к образованию нуклеотида оротидин-5′-фосфата, который при действии *оротидин-5′-фосфат декарбоксилазы* переходит в уридин-5′-фосфат:



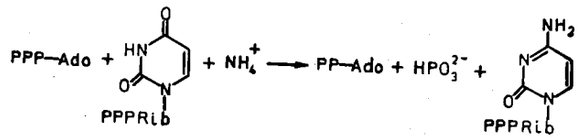
(IX.77)

С помощью соответствующих киназ (§ 4.2) уридинмонофосфат в две стадии превращается в уридин-5-трифосфат

$$P\text{—}Urd + PPP\text{—}Ado \rightarrow PP\text{—}Urd + PP\text{—}Ado$$

$$PP\text{—}Urd + PPP\text{—}Ado \rightarrow PPP\text{—}Urd + P\text{—}Ado \qquad (IX.78)$$

а последний при участии *цитидинтрифосфат синтетазы* по реакции



(IX.79)

дает цитидин-5′-трифосфат.

Сборка пуринового гетероцикла, наоборот, проходит уже на рибозофосфатном остове. Схема этой сборки приведена на рис. 121. Первым пуриновым нуклеотидом, образующимся в результате приведенной цепочки превращений, является инозин-5′-фосфат. Как видно из схемы, приведенной на рис. 122, он может либо в две стадии при участии ГТФ превращаться в аденозин-5′-монофосфат, либо окисляться NAD^+ до ксантозин-5′-фосфата и далее с участием молекулы АТФ при помощи соответствующей синтетазы образовывать гуанозин-5′-монофосфат. Как следует из приведенной схемы, пуриновый гетероцикл собирается в основном из отдельных атомов C и N. Единственным блочным элементом, используемым в этом процессе, является молекула глицина. На рис. 123 показано происхождение всех атомов пуриновой системы.

Дезоксинуклеотиды образуются из рибонуклеозиддифосфатов или рибонуклеозидтрифосфатов в результате их восстановления специальным белком *тиоредоксином*, содержащим два близко расположенных остатка цистеина, которые в ходе этого процесса образуют дисульфидный мостик. Процесс катализируется *рибонуклеозиддифосфат* и *рибонуклеозидтрифосфат редуктазами*. Регенерация

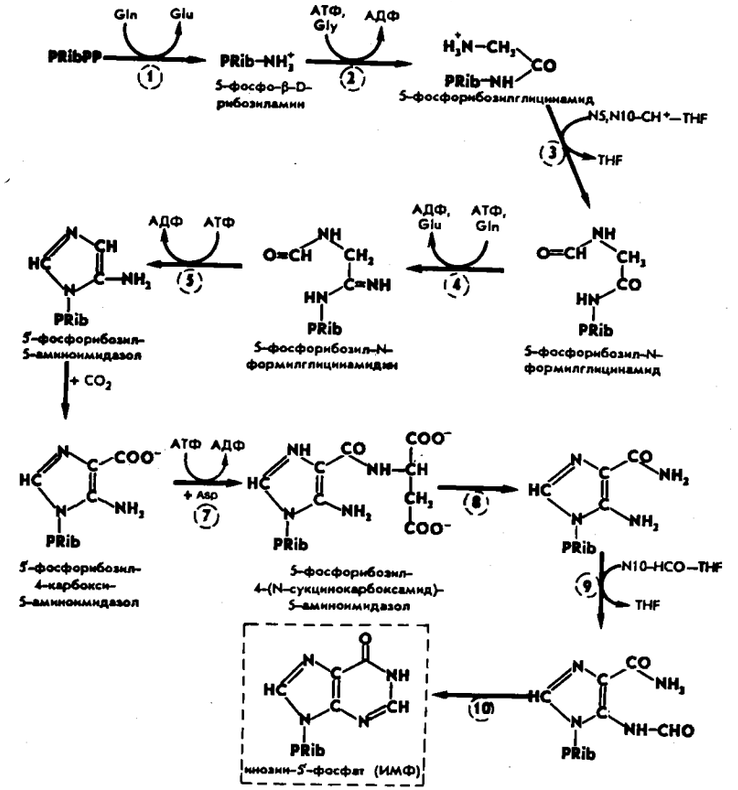
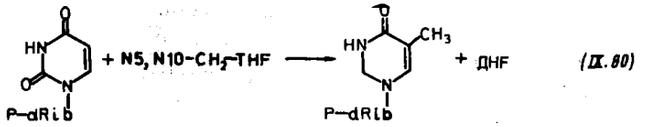


Рис. 121. Схема сборки пуринового гетероцикла. Названия ферментов, катализирующих отдельные стадии, приведены в приложении

восстановленного тиоредоксина осуществляется с помощью NADP·H и катализируется *тиоредоксин редуктазой.*

Среди образующихся дезоксирибонуклеозидтрифосфатов присутствует и дезоксиуридинтрифосфат (дУТФ), который может включаться в состав ДНК с помощью ДНК-полимераз вместо дезокситимидинтрифосфата. Во избежание этого дУТФ подвергается гидролизу до дУМФ дУТФ-*пирофосфорилазой.* Образовавшийся дезоксиуридин-5-монофосфат превращается в тимидин-5-монофосфат в результате взаимодействия с 5,10-метилентетрагидрофолатом (68 б). Процесс катализируется *тимидилат синтазой.* Особенностью этого процесса по сравнению с другими процессами переноса одноуглеродных фрагментов с помощью 5, 6, 7,8-тетрагидрофолата (THF) является восстановление метиленового фрагмента до метильного, сопровождающееся окислением THF до DNF (7,8-дигидрофолата):



(IX.80)

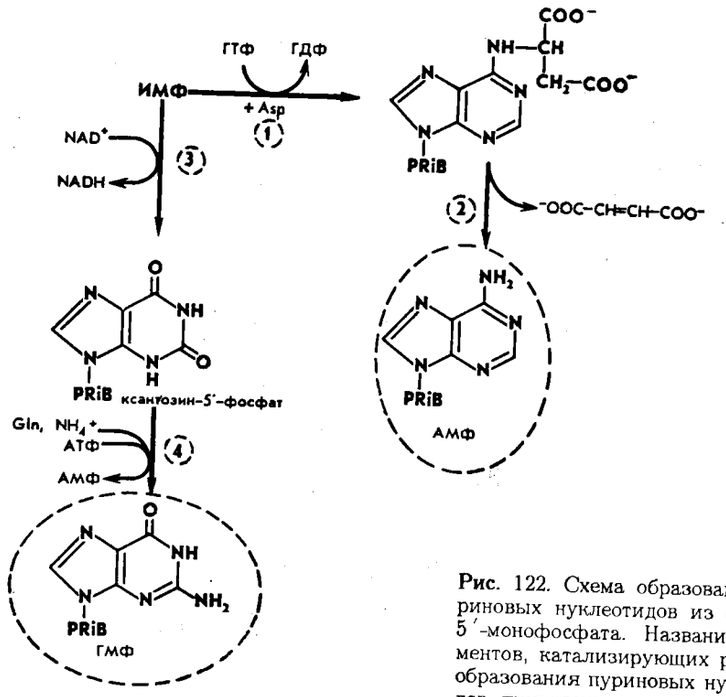


Рис. 122. Схема образования пуриновых нуклеотидов из инозин-5′-монофосфата. Названия ферментов, катализирующих реакции образования пуриновых нуклеотидов, приведены в приложении

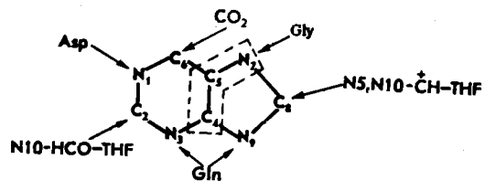


Рис. 123. Схема происхождения атомов пуринового гетероцикла

Регенерация THF, необходимая для переноса на него нового одноуглеродного фрагмента, осуществляется с помощью NADP·H при участии *дигидрофолат редуктазы*. Образовавшийся тимидин-5-монофосфат далее дважды фосфорилируется, причем на первой стадии преимущественно работает специфичная дезокситимидилат киназа.

9.7. БИОХИМИЧЕСКИЕ ЦЕПИ И ЦИКЛЫ КАК ОБЩИЙ ПРИНЦИП ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

Как известно, биохимические превращения организованы в системы процессов, катализируемых набором ферментов. Эти системы представляют собой либо цепи, не приводящие к регенерации какого-либо из исходных компонентов, либо циклы, в ходе которых процесс начинается с участием некоторой специальной молекулы, регенерируемой в последней реакции цикла. Например, глюкоза как таковая либо в виде фосфата в ходе гликолиза превращается в пируват в соотношении 2 моль на 1 моль исходной глюкозы. В цикле Кальвина первой реакцией

является взаимодействие (O_2 с рибулозо-1,5-дифосфатом, а итогом цикла является образование гексозы в количестве $^1/_6$ моль на моль фиксированного CO_2 и регенерация на последней стадии цикла рибулозо-1,5-дифосфата. При синтезе и деструкции полимерных и олигомерных молекул имеет место промежуточная ситуация — осуществляется цикл превращений, приводящий не к идентичной структуре, а к соединению того же типа, что и исходное, но соответственно удлиненное или укороченное на некоторое стандартное звено. Наиболее характерными примерами этого рода являются биосинтез и окислительная деструкция жирных кислот, в ходе которых происходит соответственно увеличение или уменьшение углеводородного фрагмента на два углеродных атома (см. § 8.3, 9.2).

Во всех рассмотренных системах биохимических процессов участвуют основные исходные вещества, которые необратимо потребляются в данной системе реакций, и продукты, которые являются итогом работы цепи или цикла. В зависимости от цели системы реакций, создание каких-либо новых соединений, производство энергии или утилизация ненужных компонентов, исходные вещества представляют собой сырье, топливо или подлежащие утилизации отходы. Так, в цикле Кальвина CO_2 является сырьем для построения новых молекул сахаров, в цикле трикарбоновых кислот ацетильные фрагменты $CoA—SCOCH_3$ подлежат сгоранию и играют роль топлива, в цикле мочевины происходит утилизация CO_2 и ионов NH_4, которые превращаются в выводимую из организма мочевину.

Практически во всех рассмотренных и в огромном числе не рассмотренных (а, по-видимому, в неменьшем числе еще и не выявленных) систем биохимических превращений наряду с сырьем или топливом используются существенно более дефицитные компоненты, ресурсы которых весьма ограничены и которые должны оперативно регенерироваться в пределах данной живой клетки или даже клеточной органеллы*. Такими компонентами являются различные коферменты и их производные. Например, синтез пуриновых нуклеотидов, описанный в предыдущем параграфе, должен сопровождаться регенерацией метенил- и формилтетрагидрофолата, гликолиз — регенерацией NAD⁺ и АДФ, цикл трикарбоновых кислот — регенерацией NAD⁺ и CoQ и т.п. Процесс регенерации может идти каким-либо одним преимущественным путем, как, например, регенерация производных THF, поскольку основным поставщиком одноуглеродных фрагментов является серин, а основным процессом — перенос гидроксиметильного фрагмента от серина на незаряженный тетрагидрофолат. В других случаях регенерация может идти множеством путей. Например регенерация АДФ, необходимой на двух стадиях гликолиза — для превращения 1,3-дифосфоглицерата в 3-фосфоглицерат и для превращения фосфоенолпирувата в пируват, может происходить за счет самых разнообразных превращений, использующих АТФ как источник энергии или источник фосфата.

Уже на примере гликолиза видно, что последовательность реакций, составляющих ту или иную цепь или цикл, не обязательно является линейной. Наряду с необходимым для продолжения цепи глицеральдегид-3-фосфатом при гликолизе из фруктозо-1,6-дифосфата образуется дигидроксиацетонфосфат, который может вернуться в гликолитическую цепь только после изомеризации. Еще более

* Речь идет именно о локально регенерируемых веществах. В рамках биосферы регенерации подлежат все соединения вплоть до CO_2, O_2 и N_2.

сложной является разветвленная система превращений триозофосфатов в цикле Кальвина (см. рис. 104).

Все представленные в двух последних главах схемы цепей и циклов изображены без каких-либо побочных по отношению к ним превращений промежуточных соединений. Практически никогда это не имеет места. Многие промежуточные соединения используются в биосинтезе нескольких совершенно различных продуктов, точно так же, как многие из них образуются не только в ходе рассматриваемых цепи или цикла, но и другими путями. В предыдущих разделах можно найти большое число примеров такого рода. Например, дигидроксиацетонфосфат наряду с превращением его в глицеральдегид-3-фосфат для продолжения гликолиза является источником глицеринфосфата для биосинтеза жиров и липидов. 3-Фосфоглицерат частично окисляется до 3-фосфогидроксипирувата, который является источником серина, глицина и одноуглеродных фрагментов. Оксалоацетат образуется не только на замыкающей реакции цикла трикарбоновых кислот при окислении малата, но и в результате переаминирования аспартата.

В системах, представляющих собой цепи, увод промежуточных соединений по побочным по отношению к данной цепи направлениям приводит лишь к уменьшению выхода целевого продукта цепи. Если же система представляет собой цикл, то побочные превращения его компонентов постепенно приведут к снижению эффективности работы всего цикла. Поэтому, как уже отмечалось, при рассмотрении цикла трикарбоновых кислот (см. § 8.4) и цикла мочевины (см. § 9.4) необходимым дополнением к любому циклу должен служить процесс (или процессы) пополнения какого-либо из его компонентов из доступного сырьевого источника. Примеры таких процессов уже приводились. По отношению к циклу трикарбоновых кислот таковой является реакция карбоксилирования пирувата, переводящая молекулы биологического топлива в компонент цикла оксалоацетат. По отношению к циклу мочевины таким процессом является биосинтез орнитина из глутамата, сырьем для углеродного скелета которого также является пируват.

Практически большинство цепей и циклов ферментативных реакций в живых организмах осложнены участием их компонентов в других системах биохимических процессов и являются в связи с этим элементами единой разветвленной сети биохимических превращений. Даже в сегодняшнем далеко не полном виде эта сеть имеет чрезвычайно сложный вид. Для иллюстрации на рис. 124 и 125 представлены соответственно все выходы и все входы гликолитической цепи и цикла трикарбоновых кислот, связанные соответственно с биосинтезом и деструкцией аминокислот.

Важное значение для функционирования живых организмов имеет термодинамическая организация систем биохимических процессов, в особенности тех, которые протекают в большом масштабе. Отдельные стадии не должны сопровождаться слишком большим уменьшением энергии Гиббса. Это важно для того, чтобы избежать неконтролируемого выделения значительного количества теплоты. На тех стадиях, где уменьшение энергии Гиббса достаточно велико, часть ее должна запасаться в легко утилизируемой форме, т.е. в виде соответствующих макроэргических связей, в первую очередь в виде пирофосфатных связей в АТФ и ГТФ. Примеры такой организации описаны при рассмотрении гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, окислительной деструкции жирных кислот. Это видно и на примере других присутствующих в значительных количествах метаболитов.

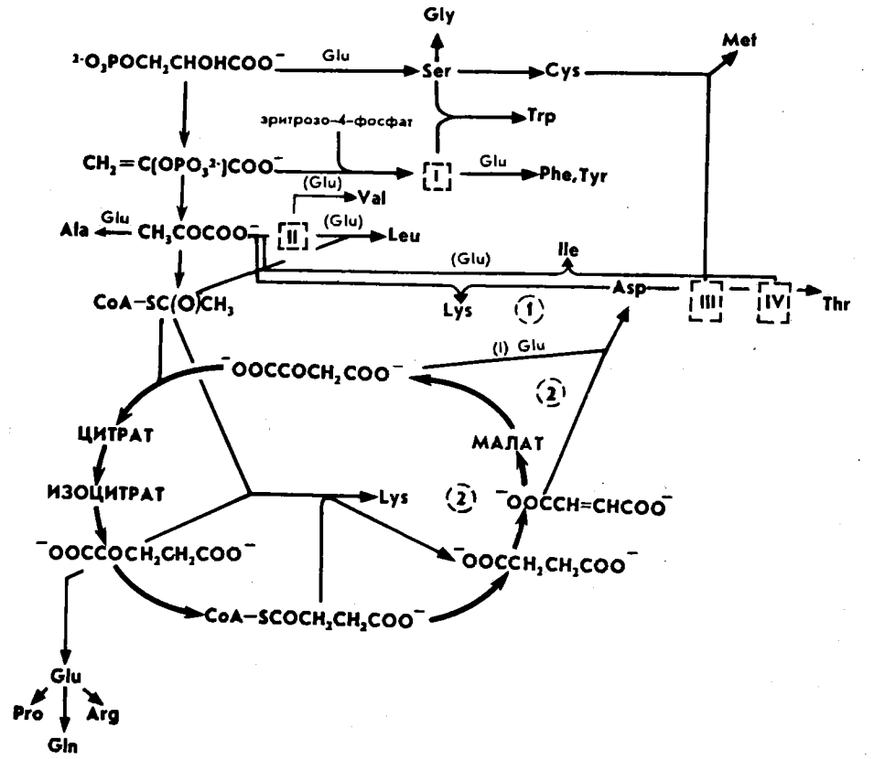


Рис. 124. Гликолитическая цепь (начиная с 3-фосфоглицерата) и цикл трикарбоновых кислот как источники предшественников для биосинтеза аминокислот (кроме гистидина):

1, 2 – альтернативные пути биосинтеза лизина и аспартата; I – хоризмат; II – α-кетоизобутират; III – гомосерин; IV – α-кетобутират

В качестве иллюстрации можно рассмотреть биоэнергетику окислительной деструкции лейцина. Как следует из реакций (IX.70) и (IX.71) и схемы, приведенной на рис. 117, в ходе деструкции образуется одна молекула NAD·H при окислительном декарбоксилировании кетолейцина, одна молекула $CoQH_2$ при дегидрировании изовалерилкофермента А и три ацетильных остатка в виде CoA—$SCOCH_3$. Последние при сгорании в цикле трикарбоновых кислот и последующих процессах, происходящих в цепи переноса электронов, обеспечивают фосфорилирование 36 молекул АДФ. Еще пять молекул АТФ накапливается за счет окисления NAD·H и $CoQH_2$, образовавшихся на первых стадиях деструкции. Принимая во внимание, что в ходе деструкции расходуется две молекулы АТФ — одна на стадии карбоксилирования 3-метилкротонилкофермента А и одна при образовании ацетоацетилкофермента А из ацетоацетата и CoA—SH, общее число молекул АТФ, образовавшихся из АДФ и ортофосфата в результате окисления одной молекулы лейцина, составляет 39. Такое же число молекул АТФ на то же число углеродных атомов (шесть) образуется при сгорании глюкозы, хотя последний процесс на самом деле биоэнергетически несколько более эффективен, поскольку суммарная

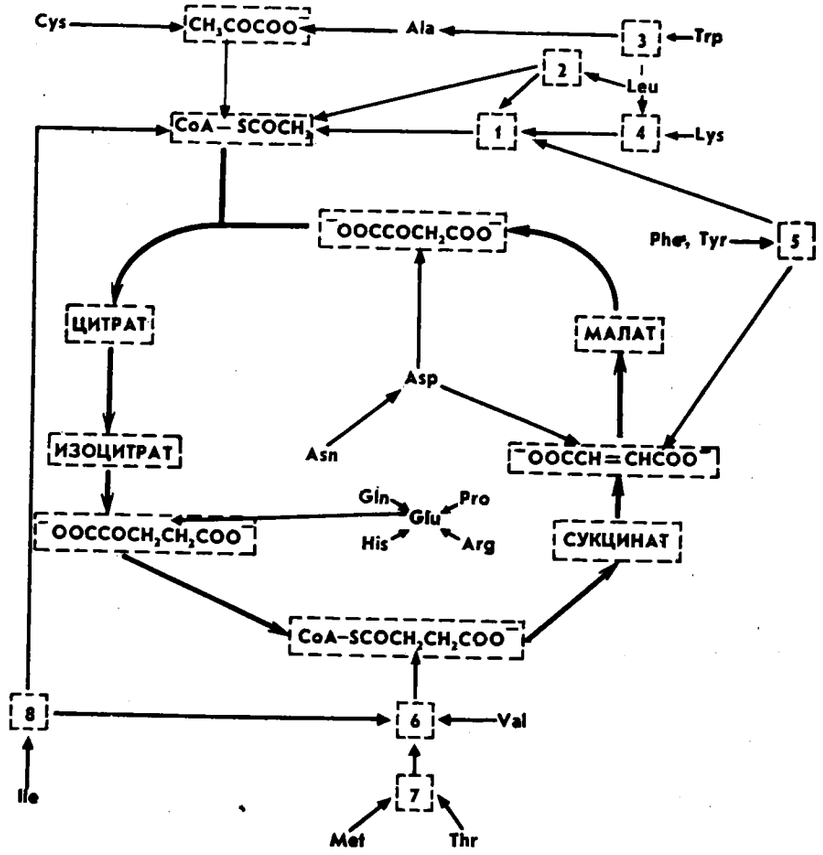


Рис. 125. Образование пирувата, ацетилкофермента А и компонентов цикла трикарбоновых кислот из аминокислот:

1 – ацетоацетилкофермент А; *2* – 3-окси-3-метилглутарилкофермент А; *3* – 3-окси-L-кинуренин; *4* – α-кетоадипат; *5* – фумарилацетоацетат; *6* – пропионилкофермент А; *7* – α-кетобутират; *8* – 3-кетоизовалерилкофермент А

степень окисления углеродных атомов в глюкозе на три единицы выше, чем у кетолейцина (соответственно 7 и 4).

В то же время если речь идет об окислительной деструкции более дефицитных компонентов, для которых к тому же нельзя ограничиться использованием механизмов, реализуемых при окислении углеводов и жирных кислот, то отдельные экзэргонические стадии не сопровождаются запасанием энергии. Так, при деструкции ароматических аминокислот, особенно при разрушении ароматических колец или гетероциклов, используются реакции оксигеназного типа и даже в отдельных случаях монооксигеназные реакции, в которых в качестве субстрата участвует дополнительный восстановитель (см. § 4.1). В качестве примера можно обратиться к деструкции фенилаланина (см. рис. 119). «Полезные» с биоэнергетической точки зрения соединения образуются из фенилаланина лишь после разрушения бензольного кольца при распаде 4-фумарилацетоацетата на фумарат

и ацетоацетат. Фумарат может служить источником пирувата, причем на промежуточном этапе при окислении малата в оксалоацетат образуется одна молекула NAD·H. Вместе с 15 молекулами АТФ, которые могут образоваться из АДФ в результате сгорания пирувата, это дает 18 молекул АТФ. За счет сгорания ацетоацетата через его превращение в две молекулы ацетилкофермента А может образоваться еще 23 молекулы АТФ. За вычетом трех молекул АТФ, которые недополучаются в результате использования одной молекулы NAD·H для регенерации тетрагидробиоптерина, общий итог составляет 38 молекул АТФ на 9 атомов С фенилаланина.

В связи с тенденцией использовать процессы с незначительным уменьшением энергии Гиббса для систем биохимических процессов характерно наличие в их составе значительного числа обратимых стадий. Это позволяет в зависимости от конкретной ситуации использовать одни и те же типы реакций, а часто и одни и те же ферменты для проведения суммарного процесса как в прямом, так и в обратном направлениях. Например, образование пролина из глутамата и его превращение в глутамат катализируется одним и тем же набором ферментов. В отсутствие существенного расхода или образования этих аминокислот они по отношению друг к другу находятся в равновесных концентрациях. В условиях интенсивного биосинтеза белков, содержащих пролин, в результате расходования последнего система ферментов будет работать в направлении синтеза пролина. В условиях интенсивной деструкции белков, содержащих пролин, та же система ферментов будет способствовать превращению пролина в глутамат. Такая организация системы биохимических превращений весьма экономична, поскольку позволяет обходиться минимальным количеством белков. А ведь каждый дополнительный белок — это и затрата значительной энергии на его биосинтез и наличие дополнительного фрагмента ДНК, несущего информацию об этом белке.

В тех случаях, когда резко преимущественным для живого организма является определенное направление системы биохимических превращений, последняя организована таким образом, чтобы суммарное значение ΔG было существенно отрицательным. Однако, как это особенно наглядно видно на примере гликолиза, это достигается путем введения наряду со значительным числом обратимых стадий нескольких необратимых, как бы запирающих процесс от протекания его в обратном направлении. При гликолизе, как уже отмечалось в § 9.1, такими стадиями являются образование фруктозо-1,6-дифосфата и превращение фосфоенолпирувата в пируват. Все остальные стадии могут в равной мере протекать в обоих направлениях и используются как при гликолизе, так и при глюконеогенезе и в темновой фазе фотосинтеза.

В качестве еще одного примера можно привести темновую фазу фотосинтеза, которая должна идти резко преимущественно в направлении восстановления фиксированного CO_2 до гексоз и регенерации рибулозо-1,5-дифосфата. В этом процессе также существенно преобладают обратимые стадии по химическому содержанию идентичные в своей первой части стадиям гликолиза, а во второй — стадиям описанного в § 9.1 взаимопревращения гексозо- и пентозофосфатов. В первой части цикла запирающей стадией является гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата до фруктозо-6-фосфата. Во второй части в такой роли выступает гидролиз фосфоэфирной группы в седогептулозо-1,7-дифосфате, предотвращающий его обратный распад до дигидроксиацетонфосфата и эритрозо-4-фосфата. Кроме того, процесс запирается на последней стадии регенерации при фосфорилирова-

нии рибулозо-5-фосфата до рибулозо-1,5-дифосфата, которое создает направленный поток превращения двух других участвующих в системе превращений пентозофосфатов в рибулозо-5-фосфат.

Несмотря на высокое совершенство организации сети биохимических превращений и оптимизации энергетики отдельных блоков этой сети, такие системы сами по себе еще совершенно недостаточны для обеспечения существования даже самых примитивных из известных на сегодняшний день форм живой материи. Системы биохимических превращений должны регулироваться — включаться и выключаться, работать быстрее или медленнее в зависимости от внешних условий и от этапов развития каждой клетки и организма в целом. Изложению некоторых основных установленных к настоящему времени принципов регуляции биохимических процессов посвящена следующая глава.

Задачи

9.1. Сопоставьте количество используемых и образующихся молекул АТФ при синтезе и сгорании лейцина.

9.2. Какое количество АТФ образуется в результате полной деструкции триптофана с использованием продуктов деградации в цикле трикарбоновых кислот и в цепи переноса электронов? Сопоставьте с результатом предыдущей задачи и объясните причину различий (без учета деструкции никотината).

9.3. Сколько квантов света должны использовать растения для синтеза одной молекулы триптофана?

9.4. Какое минимальное число квантов света расходуют каучуконосные растения на синтез одного звена молекулы каучука?

9.5. Какое количество биоэнергетических эквивалентов нужно для производства одной молекулы АТФ исходя из молекулы глюкозы, ортофосфата и NH_4^+?

9.6. В гомогенат, в котором происходит синтез протопорфирина, введен меченный ^{14}C глицин. Где обнаружится радиоактивная метка в случае, если используется а) глицин, меченный по карбоксильной группе; б) меченный по атому С2?

ГЛАВА 10

РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКЕ

Никакой, даже самый примитивный, из известных в настоящее время живых организмов в сколь угодно стабильных внешних условиях не мог бы функционировать, если бы в нем одновременно и несбалансированно протекали все запрограммированные биохимические процессы - транскрибировались все гены, транслировались все образовавшиеся информационные РНК, шли с нерегулируемой скоростью все присущие этому организму процессы синтеза и деградации низкомолекулярных соединений и биополимеров. Ясно, например, что интенсивность биосинтеза нуклеотидов и незаменимых аминокислот должна быть скоординирована с интенсивностью биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, поскольку в противном случае бесполезно растрачивались бы необходимые для производства этих мономеров сырьевые и энергетические ресурсы клеток. На самом деле живые организмы живут в непрерывно меняющихся внешних условиях и должны, кроме того, реагировать на изменения, происходящие в окружающей их среде. Так, появление в среде, на которой выращиваются бактерии, какой-либо дефицитной аминокислоты должно сопровождаться снижением уровня ее биосинтеза клетками. Появление в среде нетипичного источника углерода и энергии должно стимулировать процессы, связанные с доставкой такого вещества в клетки и его усвоением. Даже простейшие одноклеточные организмы должны располагать регуляторными механизмами, позволяющими в определенном диапазоне нивелировать действие возникающих в окружающей среде неблагоприятных внешних химических и физических факторов, таких, как появление агрессивных химических веществ, повышение температуры, интенсивное УФ-излучение.

Значение и многообразие регуляторных процессов неизмеримо возрастает при переходе от прокариот к эукариотам и особенно к многоклеточным организмам.

У многоклеточных организмов на всем протяжении их формирования и роста идут интенсивные процессы клеточного деления, многие из которых сопровождаются дифференцировкой. Рост органов, а следовательно, и обеспечивающее этот рост клеточное деление должны идти лишь до известного предела. После этого клеточные деления должны либо вообще прекратиться, либо осуществляться по мере необходимости. Например, клетки эпидермиса (наружный слой клеток кожного покрова) должны делиться лишь по мере гибели части из них в результате механических или иных повреждений. Новые эритроциты должны образовываться путем многостадийной дифференцировки стволовых клеток по мере разрушения эритроцитов в ходе их функционирования. Т-лимфоциты и В-лимфоциты должны образовываться в значительном числе из соответствующих клонов по мере развития иммунного ответа. Одним из механизмов регулирования клеточно-

го деления и дифференцировки является действие на клетки специальных регуляторных белков. Так, деление клеток эпидермиса, равно как и ряда других клеток, стимулируется небольшим белком, называемым *эпидермальным фактором роста*.

В управлении сложным процессом дифференцировки стволовых клеток костного мозга в направлении формирования зрелых эритроцитов участвует специальный белок *эритропоэтин*. Те же стволовые клетки дифференцируются в направлении формирования клеток иммунной системы при участии группы белков, известных под общим названием *интерлейкины*. Например, интерлейкин–2 стимулирует конечные фазы дифференцировки В- и Т-лимфоцитов при иммунном ответе организма на появление чужеродных антигенов.

Как в ходе индивидуального развития, так и у взрослых достаточно высоко развитых многоклеточных организмов в регуляции биохимических процессов важную роль играют эндокринная и нервная системы. Эти системы осуществляют управление со стороны одних частей организма процессами, происходящими в других его частях. Это обеспечивает в конечном итоге адекватные действия организма в ответ на сигналы, поступающие от других систем того же организма или из окружающей среды.

Система регуляции биохимических процессов является многоуровневой. Она начинает функционировать уже на уровне отдельных биополимеров, прежде всего ферментов и их комплексов. Очевидно, например, что соотношение альтернативных процессов (VIII.26) и (VIII.27) превращения пирувата - его восстановления до молочной кислоты или окислительного декарбоксилирования—зависит от того, в какой степени клетка обеспечена кислородом. В цепи биохимических процессов, приводящих к биосинтезу пиримидиновых нуклеотидов (см. § 9.6), достаточно воздействовать на первый фермент цепи - аспартат карбамоилтрансферазу, чтобы повлиять на весь процесс образования конечных продуктов. Это осуществляется с помощью ЦТФ, который выступает в роли аллостерического ингибитора фермента и служит сигналом, сообщающим о достаточном количестве пиримидиновых нуклеотидов и целесообразности прекратить их дальнейшее производство. Эти простейшие типы регуляции, основанные на влиянии концентрации одного из субстратов на соотношение альтернативных путей превращения другого субстрата или на участии аллостерических эффектов, будут рассмотрены в § 10.1.

Более сложно организованной является регуляция, основанная на изменении активности фермента или белкового фактора путем его химической модификации. Чаще всего для этой цели используют реакции фосфорилирования белков с помощью специальных, специфичных к определенным белкам или группам белков — протеинкиназ (подробнее см. § 10.2).

Огромную роль в иерархии регуляторных механизмов играет регуляция на уровне транскрипции, рассмотрению которой посвящен § 10.3. Этот механизм довольно хорошо изучен на ряде примеров у прокариот. Например, наличие в питательной среде для бактерий триптофана, который синтезируется специальной системой ферментов (см. § 9.5), делает нецелесообразным синтез этих ферментов, и соответствующий промотор для транскрипции генов, программирующих структуру этих белков, выключается с помощью комплекса специального белка, триптофанового апорепрессора, с триптофаном. Особенно большое значение регуляция транскрипции имеет у эукариот, особенно у многоклеточных организмов, поскольку даже на разных фазах клеточного цикла, а тем более на стадиях мно-

гоступенчатой дифференцировки клеток, необходимо последовательное включение и выключение экспрессии определенных систем генов.

Огромное значение для регуляции работы систем биохимических процессов имеет пространственная организация этих систем. Уже в пределах клеток эукариот многие процессы пространственно разобщены, поскольку происходят в различных органеллах. Распределение биохимических процессов по отдельным участкам клеток (*компартментализация*) будет рассмотрено в § 10.4. Уже этот вопрос выходит за рамки собственно биохимии и является в большей мере предметом клеточной биологии. Еще дальше от биохимии отстоят более высокие уровни пространственного разобщения биологических процессов по разным органам многоклеточных организмов. Так, уже говорилось о регуляторной роли эндокринной и нервной систем. Их изучение является в первую очередь предметом физиологии, которая в последние десятилетия превратилась из описательной науки в область знания, прочно опирающуюся на сведения о биохимических и биофизических процессах, протекающих в животных и растениях. Тем не менее, чтобы дать читателю некоторое представление о взаимосвязи физиологических и биохимических процессов, в § 10.5 вкратце рассматривается вопрос о биохимических аспектах мышечного сокращения - один из первых физиологических вопросов, в котором такое сложное явление, как превращение химической энергии в сокращение мышц, было в значительной мере осмыслено на основе биохимических концепций, таких, как ферментативный катализ и конформационные переходы.

В двух предыдущих главах рассматривались многие системы биохимических процессов, образующие сложную сеть превращений веществ в живых организмах. Несмотря на огромные успехи биохимии в этой области, даже сама сеть биохимических процессов еще далека от полного ее установления. Тем более это относится к системам регуляторных воздействий на эту сеть и ее отдельные фрагменты. К тому же эта проблема тесно переплетена с изучением пространственной организации биохимических процессов. Вместе взятые, эти два тесно взаимосвязанных вопроса далеко выходят за рамки биохимии и, как уже сказано выше, попадают в сферу клеточной биологии и физиологии. Поэтому настоящая глава не претендует на их систематическое изложение, в ней описаны и проиллюстрированы конкретными примерами лишь установленные на сегодняшний день некоторые общие биохимические принципы, лежащие в основе процессов регуляции, и фрагментарно затронуты отдельные, наиболее простые вопросы пространственной организации биохимических процессов.

10.1. СТЕХИОМЕТРИЧЕСКАЯ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Некоторые предпосылки для регуляции заложены в самой структуре сети биохимических превращений. Многие процессы в зависимости от конкретных условий могут реализоваться в любом из двух противоположных направлений в результате существования отдельных равновесных стадий или систем равновесных превращений. Примеры этого уже приводились в предыдущих главах. Например, вследствие равновесия между двумя триозофосфатами, быстрое установление которого катализируется триозофосфат изомеразой, в окислительных условиях, при избытке NAD^+ и интенсивном окислении 3-фосфоглицеринового альдегида

фермент направляет процесс в сторону превращения дигидроксиацетонфосфата в 3-фосфоглицериновый альдегид. В восстановительных условиях, т.е. при избытке NAD·H, и особенно в присутствии достаточного количества ацилкофермента А с длинными ацильными радикалами, тот же фермент будет способствовать преимущественному превращению альдегида в кетон, который будет восстанавливаться до глицерин-3-фосфата с последующим превращением последнего в фосфатидат - исходное соединение для синтеза фосфолипидов. Такой тип регуляции биохимических превращений, при котором преимущественное направление процесса определяется соотношением концентраций компонентов, можно назвать стехиометрической регуляцией.

В качестве еще одного примера регуляции этого типа можно привести превращения, протекающие при работе мышц. Источником АТФ, необходимой для интенсивной мышечной деятельности, является превращение глюкозы. На первой фазе глюкоза в результате цепи гликолитических превращений образует пируват. Однако дальнейшее окислительное превращение пирувата требует адекватной доставки в мышцы кислорода. Если создается дефицит последнего, то в мышечной ткани накапливаются пируват и восстановленный никотинамидный кофермент. В результате действия мышечной лактат дегидрогеназы происходит их превращение в NAD^+ и лактат, что обеспечивает регенерацию NAD^+, необходимого для дальнейшего течения гликолиза, и образование некоторого количества АТФ в результате фосфорилирования АДФ дифосфоглицератом и фосфоенолпируватом. В мышцах при этом начинает накапливаться молочная кислота. После окончания периода интенсивной мышечной деятельности образование NAD·H существенно замедляется и доставка кислорода в мышцы обеспечивает необходимый масштаб функционирования цепи переноса электронов, основная часть NAD·H переходит в NAD^+ и та же лактат дегидрогеназа обеспечивает постепенное превращение накопившегося лактата в пируват, который через стадию окислительного декарбоксилирования поступает на конечное сжигание в цикле трикарбоновых кислот.

Интересный пример регуляции, основанной на соотношении концентраций метаболитов, представляют собой завершающие стадии биосинтеза пуриновых нуклеотидов. В результате формирования пуринового гетероцикла первоначально образуется инозин-5′-фосфат (§ 9.6), который может превращаться двумя путями (см. рис.122) — с образованием аденозин-5′-монофосфата или гуанозин-5′-монофосфата. Как видно из приведенной схемы, на обоих путях необходимо участие в качестве макроэрга нуклеозид-5′-трифосфата. При этом на пути к образованию АМФ в роли макроэрга выступает ГТФ, а на пути к образованию ГМФ — АТФ. При оптимальном соотношении АТФ и ГТФ будут реализовываться оба процесса. Однако если их соотношение резко отличается от оптимального в пользу ГТФ, то процесс преимущественно пойдет в сторону образования адениловых нуклеотидов. Если же соотношение будет резко преимущественным в пользу АТФ, то в основном будут синтезироваться гуаниловые нуклеотиды. Таким образом, схема в этом узле организована так, что стимулируется преимущественное превращение инозин-5′-монофосфата в тот из двух пуриновых нуклеотидов, который оказывается в недостатке.

Как уже отмечалось в § 6.3, важным путем воздействия на активность ферментов является *аллостерическая регуляция*. Значение такой регуляции было продемонстрировано на примере фермента фосфофруктокиназы, который занимает особое положение в цепи превращений, происходящих в ходе гликолиза, поскольку катализирует практически необратимую стадию в этой цепи. Поэтому выключение работы этого фермента при благополучном с точки зрения биоэнергетики состоянии клетки особенно существенно для рационального использования ресурсов гексоз. В связи с этим фосфофруктокиназа имеет два центра связывания АТФ — один для АТФ как субстрата, другой — для АТФ как аллостерического ингибитора. Это означает, что скорость образования фруктозо-1,6-дифосфата как функция концентрации АТФ проходит через максимум. Аллостерическим ингибитором фермента является цитрат, достаточно высокая концентрация которого свидетельствует об эффективной работе цикла трикарбоновых кислот, возможной лишь при обеспеченности систем NAD^+, т. е. при интенсивной работе цепи переноса электронов и, следовательно, при высоком уровне окислительного фосфорилирования. Наоборот, АМФ и АДФ, высокий уровень которых является сигналом о дефиците энергии, являются аллостерическими активаторами фермента.

Процессом, противоположным синтезу фруктозо-1,6-дифосфата, является его гидролиз, катализируемый фруктозодифосфатазой. Этот процесс является одной из стадий глюконеогенеза, который запирает процесс в целом, выводя дифосфат из равновесия с триозофосфатами и отрезая тем самым гексозофосфатам путь назад, в сторону окислительной деструкции. Для этого фермента АМФ является аллостерическим ингибитором, сигнализируя об энергетическом дефиците, в условиях которого запасание гексоз и полисахаридов нецелесообразно.

Наличие у двух рассмотренных работающих в противоположных направлениях ферментов общего аллостерического эффектора, играющего в одном случае роль активатора, а в другом - ингибитора, имеет глубокий смысл. Этим исключается одновременная интенсивная работа обоих ферментов, которая, как следует из стехиометрических уравнений катализируемых ими реакций, свелась бы к непроизводительному гидролизу АТФ.

Еще один довольно детально изученный пример аллостерической регуляции — фермент аспартат карбамоилтрансфераза, катализирующий первую стадию биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов (см.§ 9.6). Этот фермент состоит из двенадцати субъединиц - шести идентичных каталитических и шести идентичных регуляторных.

Процесс ингибируется цитидин-5′-трифосфатом, который является конечным продуктом цепи превращений. Наличие достаточного количества ЦТФ свидетельствует об обеспеченности биосинтеза РНК и других требующих участия ЦТФ процессов и делает нецелесообразным дальнейшую наработку исходного соединения.

Аллостерическая регуляция может использоваться не только для включения и выключения работы ферментов, но и для изменения их специфичности. Это видно на примере фермента рибонуклеозиддифосфат редуктазы, катализирующей превращение всех четырех рибонуклеозиддифосфатов в соответствующие дезоксирибонуклеотиды, которые после дополнительного фосфорилирования поступают в синтез ДНК. Фермент имеет несколько регуляторных центров. Один из них, специфичный к адениловым нуклеотидам, регулирует общую скорость каталитических превращений. В этом центре АТФ работает как аллостерический активатор, а дАТФ — как аллостерический ингибитор. Но, кроме того, у фермента имеются центры, управляющие его специфичностью по отношению к разным

нуклеотидам. При этом связывание АТФ направляет работу фермента в сторону преимущественного восстановления пиримидиновых нуклеотидов, связывание дТТФ — в сторону преимущественного восстановления ГДФ, связывание дГТФ — в сторону преимущественного восстановления АДФ. Таким способом регулируется оптимальное соотношение между дезоксинуклеозидтрифосфатами, используемыми при репликации и репарации.

10.2. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ КАК ПУТЬ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ

Описанные в § 10.1 пути регуляции ключевых ферментов систем биохимических процессов являются самыми быстродействующими. Изменение концентрации аллостерического эффектора ведет к изменению количества фермента, находящегося в комплексе с эффектором, за малые доли секунды, поскольку время установления равновесия для комплексов фермент—эффектор весьма мало.

Наряду с этим в живой природе широко используется другой, не столь оперативный способ регуляции активности ферментов, основанный на ковалентном присоединении к определенным точкам фермента специфичных групп, изменяющих его каталитическую активность. Ковалентная модификация используется и для регуляции активности белков, выполняющих функции, отличные от каталитических.

Среди различных путей модификации ферментов в живых организмах, имеющих регуляторное значение, наиболее широко известно и наиболее обстоятельно изучено фосфорилирование гидроксигрупп ферментов, в первую очередь гидроксигрупп остатков серина и треонина. Фосфорилирование происходит путем переноса γ-фосфата молекулы АТФ на гидроксигруппу и катализируется специальными ферментами, известными под общим названием *протеинкиназ*. В реакциях, катализируемых протеинкиназами, участвуют два белка — один в качестве катализатора, а другой, в ряде случаев тоже фермент, в качестве фосфорилируемого субстрата.

Типичным и весьма обстоятельно изученным примером регуляции активности фермента путем его фосфорилирования является фосфоролиз гликогена. Эта реакция, катализируемая ферментом фосфорилазой (см. § 4.2), состоит в переносе концевого гликозильного остатка от молекулы гликогена на ортофосфат и имеет ключевое значение для мобилизации запасов гликогена с целью производства энергии. Очевидно, что она должна включаться при создании физиологической ситуации, требующей такой мобилизации, т.е. в том случае, когда содержание глюкозы в кровеносной системе оказывается недостаточным для обеспечения биоэнергетических потребностей организма в этой ситуации. Частично регуляция работы фосфорилазы осуществляется с помощью АМФ, который является аллостерическим активатором фермента. Однако основной регуляторный механизм основан на процессе фосфорилирования. Наиболее обстоятельно он изучен на примере фермента из скелетных мышц кролика.

В активной форме, катализирующей реакцию образования глюкозо-1-фосфата (эту форму часто называют фосфорилазой *a*), фермент представляет собой тетрамер, состоящий из четырех идентичных субъединиц. У всех субъединиц фосфорилирован остаток серина Ser-14. Однако эта форма является неустойчивой, катализирующий гидролиз фосфоэфирных связей в остатках фосфосерина фосфорилазы. В результате фермент переходит в каталитически неактивную фосфорилазу *b*, которая представляет собой димер. Таким образом, в отсутствие специальных сигналов о необходимости включения фермента в работу он находится в неактивной форме. Введение остатков фосфорной кислоты осуществляется с помощью специальной протеинкиназы - *киназы фосфорилазы*. Таким образом, превращение фосфорилазы в каталитически активный фермент требует расходования молекул АТФ, которое не учитывалось при оценке биоэнергетического баланса сжигания гликогена. Однако такое пренебрежение расходованием АТФ на регуляцию фосфоролиза вполне оправдано. На каждые четыре молекулы АТФ, передавшие свой γ-фосфат субъединицам катализатора, образуется активная молекула фермента, которая, как правило, успевает осуществить большое число актов каталитического превращения, т. е. продуцировать большое число молекул глюкозо-1-фосфата.

Киназа фосфорилазы относится к группе протеинкиназ *A*, активность которых регулируется аденозин-3′,5′-циклофосфатом (цАМФ). Такие протеинкиназы содержат наряду с каталитическими субъединицами регуляторные субъединицы, содержащие центры узнавания цАМФ, который играет роль аллостерического активатора протеинкиназы. В результате этого возникает еще одна регуляторная ступень, предшествующая активации фосфорилазы. Принципиально отличаясь по своему химическому содержанию, эта ступень тем не менее работает по сходной схеме. Появление цАМФ является ответом на внешний сигнал, включающий фермент аденилатциклазу, катализирующий превращение АТФ в цАМФ (см. § 4.4). Одновременно в клетке непрерывно функционирует фермент, катализирующий гидролиз цАМФ до АМФ - *циклонуклеотид фосфогидролаза*. Аденилатциклаза вмонтирована в клеточную мембрану и включается при поступлении на мембрану определенных сигналов. В частности, таким сигналом может служить гормон адреналин, активная наработка которого надпочечниками начинается в стрессовых ситуациях, когда организму требуется резкое усиление производства АТФ в связи с интенсификацией нервной деятельности, а зачастую и необходимостью совершить оперативно определенную механическую работу.

Включение аденилатциклазы при образовании комплекса гормон — рецептор опосредовано еще одним белком, который называют ГТФ-связывающим белком или просто белком *G*. В мембране этот белок существует в виде комплекса с ГДФ. При взаимодействии с комплексом гормон — рецептор этот белок приобретает способность к быстрому обмену молекулы ГДФ на молекулу ГТФ. В виде комплекса с ГТФ он становится активатором аденилатциклазы. После отделения этого комплекса от аденилатциклазы происходит гидролиз ГТФ до ГДФ, поскольку белку *G* присуща ГТФазная активность. Образовавшийся при этом комплекс с ГДФ может снова взаимодействовать с комплексом гормон — рецептор.

Таким образом, появление гормона вызывает целый каскад превращений. Комплекс гормон — рецептор способствует образованию комплекса ГТФ с белком *G*, последний активирует аденилатциклазу, которая, в свою очередь, производит большое число молекул цАМФ. Эти молекулы аллостерически активируют киназу фосфорилазы, а она в свою очередь переводит в активную форму фосфорилазу, запуская фосфоролиз гликогена. Вся цепочка событий представлена схематично на рис. 126. После исчезновения гормона белок *G* гидролизует связанный с ним ГТФ и становится неактивным по отношению к аденилатциклазе, накопив-

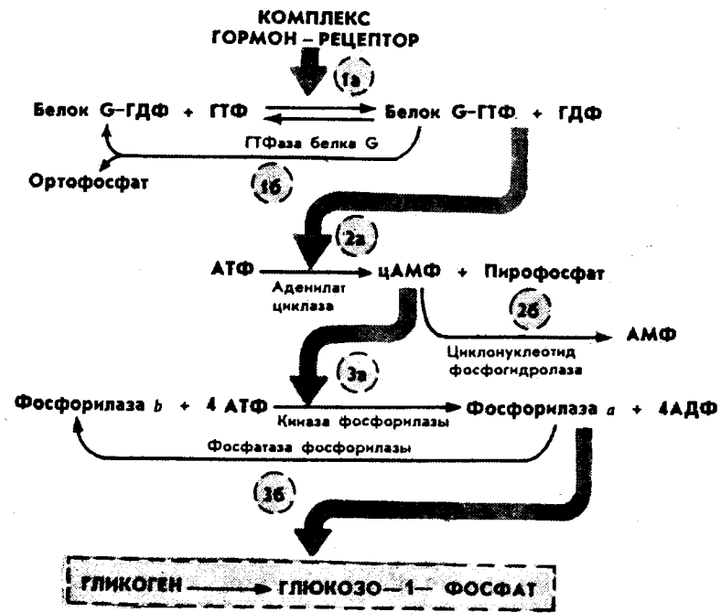


Рис. 126. Схема регуляции фосфоролиза гликогена.

Жирными стрелками показаны регуляторные воздействия, процессы *1а*, *2а*, *3а* проходят под воздействием регуляторных сигналов, процессы *1б*, *2б*, *3б* выключают эти сигналы

шийся за время функционирования последней цАМФ гидролизуется циклонуклеотидфосфогидролазой. В результате перестает функционировать нуждающаяся в присутствии цАМФ киназа фосфорилазы и фосфатаза фосфорилазы за короткое время переводит фосфорилазу в неактивную форму, т. е. расход гликогена на производство глюкозо-1-фосфата прекращается.

Существенно, что та же система регулирует одновременно работу гликогенсинтазы (см. § 9.1). Однако направление работы двух конечных регуляторных элементов - киназы и фосфатазы - в этом случае диаметрально противоположное. Активной формой гликогенсинтазы является ее дефосфорилированная форма. Поэтому в отсутствие каталитически активной протеинкиназы при прочих благоприятных условиях функционирует гликогенсинтаза и в клетках идет синтез гликогена. Наоборот, фосфорилированная форма гликогенсинтазы ферментативно неактивна, поэтому в период действия сигнала, включающего аденилатциклазу и таким путем активирующего протеинкиназу, гликогенсинтаза фосфорилируется и становится неактивной, т.е. синтез гликогена прекращается. Аналогично тому, как это было уже рассмотрено на примере пары фосфофруктокиназа — фруктозодифосфатаза, такая система регуляции практически исключает одновременную работу двух противоположно действующих систем — синтеза и фосфоролиза гликогена. Нетрудно убедиться, рассматривая совместно оба превращения, что при одновременном их протекании итогом было бы бесполезное превращение уридинтрифосфата и ортофосфата в уридиндифосфат и пирофосфат по схеме

$$\text{Glc-1–P} + \text{PPP–Urd} \longrightarrow \text{Glc-1–PP–Urd} + \text{PPi} \qquad \text{(X.1)}$$

$$\text{Glc-1–PP–Urd} + \text{Glc}_n\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_{n-1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–}\ldots\longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Glc}_{n+1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_n\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_{n-1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–}\ldots + \text{PP–Urd} \qquad \text{(X.2)}$$

$$\text{HPO}_4^{2-} + \text{Glc}_{n+1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_n\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_{n-1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–}\ldots\longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Glc-1–P} + \text{Glc}_n\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–Glc}_{n-1}\text{-}\alpha\,(1-4)\text{–}\ldots \qquad \text{(X.3)}$$

Важное значение в регуляции процессов дифференцировки и размножения клеток имеет *протеинкиназа С*. Этот фермент активируется, как и протеинкиназы класса *А*, в результате взаимодействия специальных рецепторов клеточной мембраны с соответствующими эффекторами, которыми в случае протеинкиназы *С* являются некоторые гормоны и факторы роста. Активированная протеинкиназа *С* катализирует фосфорилирование определенного набора белков, что, по-видимому, является промежуточным этапом каскада превращений, заканчивающегося в ядре запуском репликации ДНК и сопутствующих процессов.

Непосредственными активаторами протеинкиназы *С* являются ионы Ca^{2+} и 1,2-диацилглицерин, причем в положении 1 этого соединения преимущественно находится остаток стеариновой, а в положении 2 - арахидоновой кислоты. Важным участком активации является присутствующий в мембранах регулируемых клеток фосфолипид *фосфатидилинозит* (156) (рис. 127). Это соединение последовательно фосфорилируется до 4-фосфата и 4,5-дифосфата. Взаимодействие рецептор - эффектор активирует специфическую фосфолипазу, катализирующую гидролиз *фосфатидилинозит-4,5-дифосфата* до *1,2-диацилглицерина* и инозит-1,4,5-трифосфата. Имеются данные, что последний продукт участвует в мобилизации запасов ионов Ca^{2+}, необходимого вместе с диацилглицерином для актива-

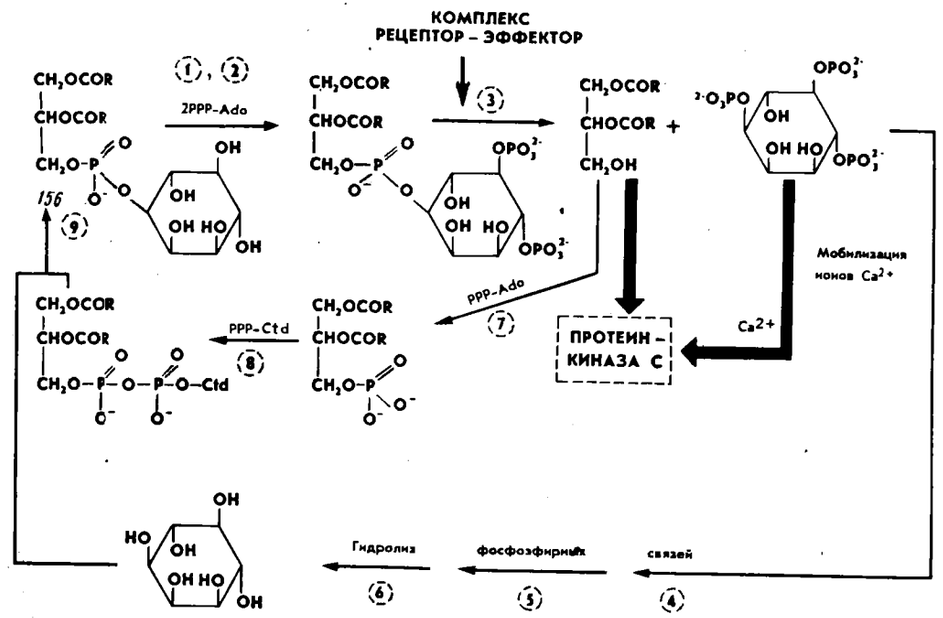


Рис. 127. Схема регуляции протеинкиназы *С* (см. текст). Жирными стрелками показаны регуляторные воздействия

ции протеинкиназы *C*. Оба продукта гидролиза, как показано на рис. 127, впоследствии в несколько стадий снова превращаются в фосфатидилинозит.

По-видимому, большое значение в процессах регуляции клеточного деления имеет группа белков, программируемых так называемыми *онкогенами*. Измененные (мутантные) формы этих генов обнаруживаются в опухолевых клетках и входят в ряде случаев в виде соответствующих РНК-копий в состав онкогенных (т.е. вызывающих опухоли) ретровирусов. Первым открытым онкогеном был ген src, входящий в состав вируса саркомы Рауса. Программируемый им белок, продукт гена src, оказался протеинкиназой, которая в отличие от протеинкиназ класса *A* и протеинкиназы *C* катализировала фосфорилирование определенного спектра клеточных белков по остаткам тирозина, а не по остаткам серина и треонина. Дальнейшие исследования показали, что такая активность присуща некоторым рецепторам факторов роста, в частности рецептору *эпидермального фактора роста*. Ген erd, программирующий аналог этого рецептора, был обнаружен в составе онкогенного вируса птичьего миелобластоза. В настоящее время открыто несколько десятков онкогенов. В большинстве изученных случаев продукты этих онкогенов в здоровых клетках являются участниками передачи митогенных (т. е. управляющих митозами) сигналов. В ряде опухолей, в том числе человеческих, найдены онкогены, программирующие аналоги белка G,воспринимающего сигналы от комплексов эффектор - рецептор (в частности, онкогены H—ras и K—ras); онкогены, программирующие синтез аналогов самих факторов роста, например онкоген sis, входящий в состав вируса саркомы обезьян, продукт которого является аналогом фактора роста, выделяемого тромбоцитами (клетками крови, участвующими в процессе свертывания); онкогены, продуктами которых являются аналоги ядерных белков, по-видимому, участвующих на заключительных этапах каскада превращений, возникающего в ответ на митогенный сигнал (онкогены myc, fos и др.).

10.3 РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

В ходе функцинирования клеток огромное значение имеет синтез новых молекул РНК. Вслед за синтезом информационных РНК начинается процесс их трансляции, т. е. синтез запрограммированных ими белковых молекул. Эти процессы требуют затрат большого числа исходных мономеров и значительного количества энергии для перевода мономеров в активные формы - соответственно нуклеозид-5′-трифосфаты и аминоацил-тРНК. В связи с этим весьма существенна возможность регуляции транскрипции, т. е. включения ее в момент, когда возникает потребность в создании новых белковых молекул, и выключения по мере исчезновения такой необходимости. Наиболее обстоятельно регуляция транскрипции изучена для прокариот, и в рамках данного курса в основном будут излагаться важнейшие пути этой регуляции, установленные для микроорганизмов.

Объектами регуляции у прокариот являются *опероны*, т. е. несколько расположенных один за другим генов вместе с предшествующим регуляторным участком ДНК. В настоящее время известно большое число регулируемых оперонов. Для некоторых из них существуют специальные регуляторные белки, образующие комплекс с ДНК в районе промотора и области начала транскрипции для соответствующего оперона. Участок, с которым взаимодействует регуляторный белок, называют *оператором*. Одним из наиболее изученных является регуляторный белок лактозного оперона, так называемый *lac-репрессор*. *Лактозный оперон*

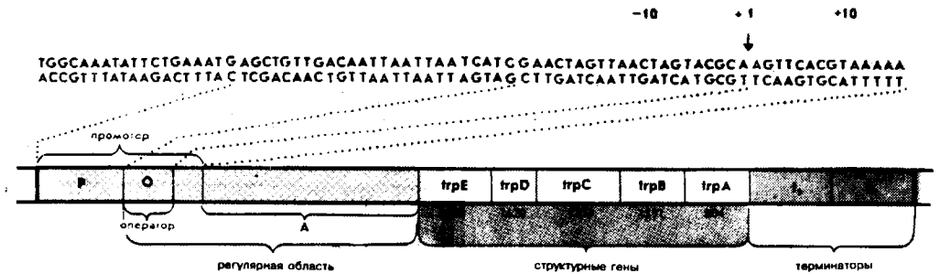


Рис. 128. Схема триптофанового оперона *E.coli*.

Транскрипция инициируется в положении +1. На транскрибируемом фрагменте А имеются участки, подверженные другим видам регуляции, не описанным в тексте

программирует производство трех белков. Два из них имеют самое прямое отношение к усвоению лактозы — это *β-галактозидаза*, катализирующая гидролиз β-D-галактозидов, в том числе гидролиз лактозы до галактозы и глюкозы, и β-галактозидпермеаза, необходимая для прохождения β-галактозидов, в том числе лактозы, через клеточную мембрану. Третий ген того же оперона программирует *β-галактозидтрансацетилазу*, катализирующую перенос ацетильного остатка от ацетилкофермента А на галактозу. Значение этого фермента при использовании клетками лактозы неизвестно. В отсутствие лактозы lac-репрессор прочно связан с оператором и препятствует связыванию с промотором РНК-полимеразы, т. е. процессу транскрипции оперона. Не происходит, соответственно, и синтеза программируемых опероном белков (т. е. экспрессии генов оперона). Главной особенностью lac-репрессора является его способность к образованию специфического комплекса с β-галактозидами, сопровождающемуся потерей сродства к оператору. В результате при появлении β-галактозидов происходит освобождение промотора и влючается экспрессия генов оперона. При этом синтезируется единая молекула мРНК, несущая информацию о всех программируемых опероном белках. Такое включение биосинтеза РНК и белков в результате появления β-галактозидов получило название *индукции*. Как видно из вышеизложенного, индукция производства белков – продуктов лактозного оперона – является результатом удаления с операторного участка репрессора с помощью индуктора.

Известна и детально изучена и обратная ситуация. В норме бактериальные клетки продуцируют набор белков, необходимых для превращения хоризмата в триптофан (см. рис. 115). Этот набор белков программируется пятью генами, расположенными в *триптофановом опероне*, схема которого представлена на рис. 128. При дефиците триптофана оперон нормально функционирует. Однако при появлении избытка триптофана он образует комплекс со специальным белком - *апорепрессором*, обладающим высоким сродством к операторному участку триптофанового оперона. В результате оперон целиком выключается. Это явление получило название *репрессии*. В роли репрессора в данном случае выступает комплекс апорепрессора с триптофаном.

В обоих случаях регуляция осуществляется с помощью специальных белков, нацеленных на регуляцию определенного оперона. Существуют аналогичные регуляторные белки с более широким спектром действия. Важнейшим их представителем у бактерий является *белок активатор катаболизма* (CAP, catabolite

activating protein). Этот белок выступает в роли репрессора транскрипции сразу нескольких оперонов, общим для которых является то, что программируемые ими группы белков участвуют в первых стадиях использования нетрадиционных источников энергии — галактозы, арабинозы, лактозы (в последнем случае в опероне имеются два операторных участка — один для связывания с lac-репрессором, другой для связывания с CAP). Непосредственным индуктором вытупает в этом случае цАМФ, имеющий сродство к белку CAP и резко снижающий его сродство к соответствующему оператору. Если в клетке достаточно глюкозы, то цАМФ в заметных количествах не образуется и все опероны оказываются в репрессированном состоянии. При истощении запасов глюкозы включается образование цАМФ и происходит индукция целого набора оперонов. *

Большое значение в прокариотических клетках имеет *авторегуляция транскрипции*, заключающаяся в подавлении транскрипции одним из продуктов оперона. Например, триптофановый апорепрессор выступает в качестве репрессора гена, программирующего этот апорепрессор. Поэтому последний никогда не накапливается в клетке в значительном количестве. Широко используется авторегуляция транскрипции оперонов, программирующих рибосомные белки. Гены рибосомных белков сгруппированы в несколько оперонов. Например, оперон S10 содержит расположенные друг за другом гены рибосомных белков S10, L3, L2, L4, L23, S19, L22, S3, S17, L16 и L29 (белки серии S - из малой, а серии L - из большой субъединицы). Регуляторным белком, подавляющим экспрессию этого оперона, является один из его продуктов — белок L4.

Регуляция транскрипции у эукариот отличается от регуляции у прокариот прежде всего тем, что эукариотические РНК-полимеразы при всей сложности их строения сами по себе не в состоянии осуществлять правильную транскрипцию ДНК как в свободном состоянии, так и в составе хроматина, где они реально функционируют. Для инициации транскрипции нужны специальные белковые факторы, разные для трех разных типов эукариотических РНК-полимераз. В настоящее время наиболее детально изучены *факторы транскрипции*, необходимые для функционирования РНК-полимеразы III, транскрибирующей гены транспортных РНК и рибосомной 5S РНК. Причем для этих двух разных типов низкомолекулярных РНК нужны и различные факторы — TFIIIA для генов 5S РНК и TFIIIB и TFIIIC для генов тРНК.

Транскрипция генов, программирующих белки, которая осуществляется РНК-полимеразой II, должна быть под особенно тонким контролем и в ряде случаев регулируется с помощью специальных белков, образующих комплексы с поступающими извне управляющими веществами. К числу последних относятся различные стероидные гормоны, которые в отличие от пептидных гормонов и катехоламинов (адреналин и др.) имеют наряду с мембранными внутриклеточные рецепторы. Проникая в цитоплазму, они образуют с этими рецепторами комплексы, способные преодолевать ядерную мембрану, достигать регулярных участков хроматина и инициировать транскрипцию соответствующих генов.

В последнее время выявлено несколько регуляторных белков, ответственных за дифференцировку и формообразование (морфогенез). Ведется интенсивный поиск и уже достигнуты определенные успехи в выявлении белков, функционирующих лишь в определенных тканях и вызывающих тканеспецифичную транскрипцию. Так, имеются сообщения об обнаружении в клетках гипофиза специального белка, индуцирующего транскрипцию генов, кодирующих гормон роста и пролактин - пептидные гормоны, продуцируемые гипофизом. Описано также выделение из тканей иммунной системы белка, который индуцирует транскрипцию генов иммуноглобулинов. Все это, однако, — лишь первые ласточки. Выявление всего комплекса регуляторных механизмов и всего набора регуляторных белков находится в начальной фазе исследования. Огромное значение этого вопроса для понимания биохимических основ развития и функционирования многоклеточных организмов и особенно человека, несомненно, будет стимулировать быстрый прогресс в развитии этой области биохимии.

*Природа взаимосвязи между содержанием глюкозы и образованием цАМФ в бактериальных клетках еще не вполне ясна.

10.4. КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Жизнь представляет собой наиболее высокоорганизованную из существующих в природе форм организации материи. Ее основными атрибутами являются пространственная структура, в том числе распределение в пространстве систем протекающих в живых организмах биохимических процессов и регуляция их протекания во времени. Последний вопрос был рассмотрен в предыдущем параграфе. Этот параграф посвящен краткому изложению вопросов, связанных с пространственной организацией биохимических процессов.

Первым уровнем в иерархии структур, формирующих живые организмы, являются сами биополимеры. Они уже представляют собой уровень организации материи более высокий, чем низкомолекулярные органические соединения и полимеры, построенные из одинаковых мономерных звеньев. Уникальная первичная структура, т. е. определенный порядок, в котором для каждого биополимера располагаются вдоль цепи составляющие его разнотипные мономеры, закладывает основу для формирования уникальной пространственной структуры, вторичной и третичной, или нескольких таких структур, между которыми возможны направленные конформационные переходы. Об этом много говорилось в предыдущих главах, поэтому здесь этот вопрос не рассматривается.

Следующим уровнем пространственной организации являются надмолекулярные структуры — комплексы, образованные несколькими белками, и нуклеопротеиды. Так, в биосинтезе белка неотъемлемым элементом являются такие сложные надмолекулярные структуры, как рибосомы. Основные стадии репликации, репарации и траскрипции ДНК у эукариот проходят в чрезвычайно сложной многокомпонентной структуре, какой является хроматин. Ранее неоднократно упоминались в разных контекстах многосубъединичные белки с аллостерическим взаимодействием между субъединицами.

Все живые организмы, включая простейших прокариот, отделены от окружающей среды клеточной мембраной. При этом роль мембран не ограничивается просто механическим отделением содержимого клетки. Они необходимы также для протекания некоторых основополагающих для живой материи процессов, в первую очередь производства АТФ. Как при окислительном фосфорилировании, так и при фотосинтезе сложный надмолекулярный комплекс, вмонтированный в мембрану, обеспечивает создание трансмембранного градиента концентрации протонов, за счет которого и происходит фосфорилирование АДФ.

У эукариот оба перечисленных принципа организации — образование надмолекулярных структур и наличие процессов, требующих участия двух фаз, разделенных мембранами, — не только сохраняются, но и используются в значительно более разнообразных вариантах. Но наряду с этим в клетках эукариот широко эксплуатируется следующая по уровню сложности форма организации биохимических процессов — распределение их по клеточным органеллам.

У многоклеточных организмов важнейшим элементом пространственной организации биохимических процессов является распределение их между разными типами клеток, а также межклеточные взаимодействия. Многие процессы происходят фактически лишь с участием высокоорганизованного конгломерата клеток. К их числу относится мышечное сокращение (см. § 10.6).

Общим для всех уровней организации является вопрос о путях сборки этих структур. У многоклеточных организмов это решается в первую очередь в процессе индивидуального развития. У одноклеточных организмов основные элементы пространственной структуры закладываются в период деления клетки. У эукариот это сопряжено с такими сложными процессами, как конденсация и деконденсация хромосом. Эти процессы сегодня являются предметом в первую очередь феноменологического описания, и имеются лишь отдельные отрывочные сведения о лежащих в их основе биохимических превращениях. На молекулярном уровне в настоящее время ведутся исследования самосборки надмолекулярных структур — рибосом, вирусов.

Клетки эукариот богаты различными органеллами. Прежде всего это клеточное ядро, в котором происходят все процессы с участием ядерной ДНК, входящей в состав хроматина, в первую очередь процессы репликации, репарации и транскрипции. Даже в пределах ядра имеется распределение процессов между отдельными его частями. Наиболее четко это выражено в случае синтеза рибосомных РНК и формирования рибосом. Участки хроматина, содержащие гены рибосомных РНК, находятся в виде петель хроматина в определенной области ядра, называемой *ядрышком*. Здесь происходит их транскрипция с помощью РНК-полимеразы I и первые фазы формирования рибосом. Рибосомные белки, необходимые для сборки рибосом, поступают из цитоплазмы, в которой сосредоточено их производство.

В связи с биосинтезом рибосом интересно упомянуть важную особенность этого процесса, имеющую прямое отношение к самосборке надмолекулярных структур. Рибосомные РНК эукариот транскрибируются в виде единого предшественника, так называемой 45S РНК, содержащей в своем составе полные нуклеотидные последовательности для трех из четырех рибосомных РНК эукариот, а именно 28S, 18S и 5,8S РНК. Сборка нуклеопротеидной структуры начинается на этой единой полинуклеотидной цепи и приводит к образованию единого предшественника рибосомы, уже содержащего бо́льшую часть из числа примерно 70 рибосомных белков, входящих в зрелые рибосомные частицы. В них содержатся также некоторые дополнительные белки, в конечной структуре отсутствующие и, по-видимому, нужные на промежуточных этапах сборки. Только после этого происходит первая фаза процессинга рибосомных РНК, приводящая к формированию предшественников рибосомных субъединиц. Незрелые субъединицы выходят на определенном этапе их формирования из ядрышка и ядра в цитоплазму, где они проходят заключительные фазы процессинга и превращаются в зрелые рибосомы. На этом примере видно, что для правильной сборки сложных нуклеопротеидов необходимы и дополнительные полинуклеотидные фрагменты, отсутствующие в завершенной структуре, и некоторые дополнительные белки, которые в данном случае скорее всего вообще не выходят за пределы ядрышка и сохраняются в нем для повторного участия в формировании новых предшественников.

Наиболее детально вопрос о распределении биохимических процессов между клеточными органеллами изучен на примере митохондрий. Главным назначением митохондрий является окислительное фосфорилирование. В митохондриях происходят такие процессы, как цикл трикарбоновых кислот, окисление жирных кислот, собственно окислительное фосфорилирование и некоторые другие превращения, о которых будет сказано ниже. Системы, осуществляющие перечисленные процессы, распределены между различными отделами митохондрий. Так, комплекс белков, осуществляющих перенос электронов от NAD·H к молекулярному кислороду и сопряженное фосфорилирование АДФ, полностью вмонтирован во внутреннюю митохондриальную мембрану. Цикл трикарбоновых кислот функционирует в митохондриальном матриксе, за исключением стадии дегидрирования сукцината, которое осуществляется с помощью сукцинат дегидрогеназы, также входящей в состав внутренней мембраны. Пируватдегидрогеназный комплекс и система ферментов, катализирующих окисление жирных кислот, поставляющие ацетил-CoA в цикл трикарбоновых кислот, целиком сосредоточены в матриксе.

Уже из этого краткого перечисления следует, что у митохондрий должно существовать интенсивное общение с окружающей средой. В них должны поступать жирные кислоты и пируват, который производится системой гликолитических ферментов, функционирующей в цитоплазме. В митохондрии должен также поступать АДФ и ортофосфат, а из них должен выводиться АТФ.

К этому можно добавить, что митохондрии являются активными участниками некоторых этапов азотного обмена. В матриксе функционирует глутамат дегидрогеназа, продуцирующая при работе в направлении образования α-кетоглутарата ионы NH_4^+. В связи с необходимостью их удаления в матриксе сосредоточены первые этапы цикла мочевины — образование карбамоилфосфата и его взаимодействие с орнитином с образованием цитруллина. Поэтому в митохондрии должны поступать ионы аммония и орнитин, а из них в цитоплазму должен выводиться цитруллин.

Существует несколько форм транспорта веществ через митохондриальную мембрану. Прежде всего это пассивный транспорт незаряженных молекул, таких, как CO_2, O_2 и некоторые другие. Кроме того, в незаряженной форме через мембраны митохондрий проходят ионы аммония в виде аммиака и некоторые цвиттерионные соединения, например цитруллин. Существуют специальные системы, обеспечивающие согласованный встречный транспорт анионов. Так, по-видимому, согласованно переносятся анионы $H_2PO_4^-$ и OH^- и ряд других пар анионов. Некоторые заряженные частицы предварительно превращаются в незаряженные молекулы, как это, например, имеет место при переносе ацильных остатков с помощью карнитина. Этот механизм избавляет митохондрии от необходимости транспортировать такие громоздкие заряженные молекулы, как ацильные производные кофермента А.

Особо следует отметить вопрос о переносе адениловых нуклеотидов. Для этой цели мембраны митохондрий снабжены специальным белком — *переносчиком*

адениловых нуклеотидов. Этот белок обладает специфичным сродством к двум аденоловым нуклеотидам — АТФ и АДФ. Перенос АМФ он осуществлять не может, и для ликвидации АМФ, образующегося внутри митохондрий, в межмембранном пространстве находится аденилат киназа, переводящая монофосфат в дифосфат.

Митохондрии располагают своим собственным аппаратом для хранения и экспрессии их генетической информации. Эта информация, содержащаяся в митохондриальной ДНК, включает программы для синтеза специальных митохондриальных транспортных и рибосомных РНК. Кроме того, в митохондриальной ДНК запрограммировано несколько полипептидов, участвующих в выполнении основных функций митохондрий. В их числе некоторые из субъединиц цитохром оксидазы и АТФ-синтазы. Однако бóльшая часть белков программируется в ядре и синтезируется в цитоплазме вне митохондрий. Это же полностью относится к белкам, обслуживающим генетический аппарат митохондрий: к митохондриальным ДНК- и РНК-полимеразам, к белкам митохондриальных рибосом, которые резко отличаются от цитоплазматических рибосом и по своим основным характеристикам приближаются к рибосомам прокариот, а также к аминоацил—тРНК-синтетазам, катализирующим аминоацилирование митохондриальных тРНК. Следовательно, митохондрии должны располагать механизмом для транспорта в них широкого спектра белков, синтезируемых в цитоплазме. То же в общих чертах можно отнести и к функционированию генетического аппарата хлоропластов.

Помимо ядра и митохондрий в клетках эукариот существует и функционирует значительное число других органелл. Среди них следует в первую очередь упомянуть систему *эндоплазматического ретикулума*, которая представляет собой большое число ограниченных мембранами слоев, пузырьков, трубочек. Мембраны эндоплазматического ретикулума образуют, по-видимому, единую систему, связанную также с ядерной мембраной. Различают гладкий эндоплазматический ретикулум, имеющий трубчатое строение, в котором происходит в основном метаболизм липидов. Кроме того, широко представлен шероховатый эндоплазматический ретикулум, на внешних поверхностях которого закреплены рибосомы. На этих рибосомах происходит синтез многочисленных мембранных белков.

В транспортировке белков в различные части клетки и в подготовке белков к секреции большая роль принадлежит *аппарату Гольджи*, который состоит из стопки уплощенных мембранных пузырьков. В частности, аппарату Гольджи отводят важную роль в маркировке белков, поступающих в клеточную мембрану. Эти белки в большей части представляют собой гликопротеиды, причем они снабжены специфическими олигосахаридами. Это дает основание считать, что они участвуют в специфических межклеточных взаимодействиях. В аппарате Гольджи осуществляется гликозилирование белков перед их доставкой к клеточной мембране.

Кроме этих органелл уже упоминались лизосомы - окруженные мембранами образования, содержащие набор гидролаз и обеспечивающие гидролитическое расщепление поступающих в клетку биополимеров. В отдельные структуры заключены ферменты, которые катализируют оксидазные реакции, приводящие к образованию пероксида водорода, и содержат каталазу для его уничтожения. Эти органеллы получили название *пероксисом*.

Таким образом, уже из этого краткого перечисления видно, что распределение

ферментов и систем ферментов (компартментализация) между определенными органеллами или их частями является важнейшим элементом пространственной организации биохимических процессов, особенно в эукариотических клетках.

10.5. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Мышечное сокращение является процессом, в ходе которого происходит превращение химической энергии, запасенной в виде макроэргических пирофосфатных связей в молекулах АТФ, в механическую работу. По объему, который приходится на долю мышц у высших организмов, в том числе у человека, и по масштабу биохимических превращений, обслуживающих прямо или косвенно мышечное сокращение, этот процесс занимает первое место среди всех физиологических процессов. Даже в состоянии покоя на его долю приходится до 40% от всего объема метаболизма, а при интенсивной механической работе организма эта доля может достичь 75%. Непосредственными участниками процесса сокращения являются два белка — миозин и актин. Большое число молекул каждого из этих белков объединены в виде специальных конструкций, вне которых сокращение совершаться не может.

Миозин представляет собой белок необычного строения, состоящий из длинной нитевидной части (хвост) и двух глобулярных головок. Общая длина одной молекулы составляет порядка 1600 нм, из которых на долю головок приходится около 200 нм. Миозин обычно выделяется в виде гексамера, образованного двумя одинаковыми полипептидными цепями с молекулярной массой 200 000 каждая (так называемые тяжелые цепи) и четырьмя легкими цепями с молекулярной массой около 20 000. Тяжелые цепи закручены спиралью одна вокруг другой, образуя хвост, и несут на одном конце глобулярные головки, ассоциированные с легкими цепями. На головках миозина находятся два важных функциональных центра — каталитический центр, способный в определенных условиях осуществлять гидролитическое расщепление β-γ-пирофосфатной связи АТФ*, и центр, обеспечивающий способность специфично связываться с другим мышечным белком — актином.

Актин является глобулярным белком с молекулярной массой 42 000. В таком виде его называют *G*-актином. Однако он обладает способностью полимеризоваться, образуя длинную структуру, называемую *F*-актином. В такой форме актин способен взаимодействовать с головкой миозина, причем важной чертой этого взаимодействия является его зависимость от присутствия АТФ. При достаточно высокой концентрации АТФ комплекс, образованный актином и миозином, разрушается. После того как под действием миозиновой АТФазы произойдет гидролиз АТФ, комплекс снова восстанавливается. Этот процесс легко наблюдать в растворе, содержащем оба белка. В отсутствие АТФ в результате образования высокомолекулярного комплекса раствор становится вязким. При добавлении АТФ вязкость резко понижается в результате разрушения комплекса, а затем начинает постепенно восстанавливаться по мере гидролиза АТФ. Эти взаимодействия играют важную роль в процессе мышечного сокращения.

В то же время сами по себе описанные процессы к каким-либо направленным

*АТФазная активность миозина открыта акад. В.А. Энгельгардтом.

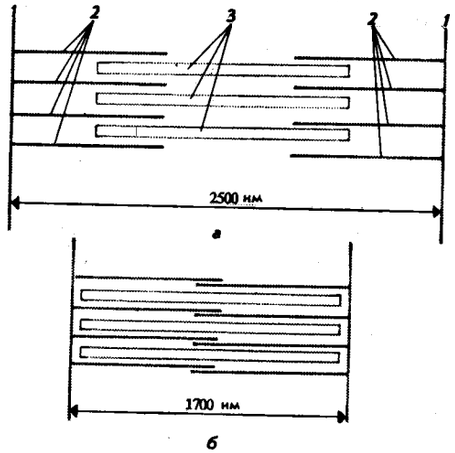


Рис. 129. Схема функциональной единицы миофибриллы – саркомера – в покоящемся (*а*) и сокращенном состояниях (*б*):

1 – Z-пластинки; *2* – тонкие (актиновые) нити; *3* – толстые (миозиновые) нити

механическим перемещениям не приводят. В мышцах оба белка участвуют в формировании специальных структур, входящих в состав мышечных волокон. Ниже речь будет идти о волокнах скелетных мышц, которые вместе с соединительной тканью образуют мышцу. Каждое отдельное волокно представляет собой многоядерную клетку со своей плазматической мембраной, называемой сарколеммой. Важнейшая функция последней — восприятие сигналов, поступающих от нейронов, и передача их внутрь волокна, в котором находятся многочисленные *миофибриллы*, окруженные цитоплазмой и митохондриями. В цитоплазме содержится в значительном количестве миоглобин, выполняющий функцию промежуточного переносчика кислорода от омывающих мышцу кровеносных сосудов к мышечным митохондриям, и ряд ферментов, принимающих вместе с митохондриями участие в энергетическом обеспечении мышечного сокращения.

Функциональной единицей миофибриллы является *саркомер* (рис. 129).Его тремя главными элементами являются так называемые *Z*-пластинки, отделяющие саркомер от его соседей, закрепленные на этих пластинках две группы тонких нитей длиной порядка 1000 нм и толщиной около 6 нм, и толстые нити, располагающиеся между тонкими нитями так, что каждая толстая нить окружена шестью тонкими и наоборот (гексагональная упаковка). Толстые нити имеют длину порядка 1500 нм и диаметр 14 нм и могут при определенных условиях скользить между ними. Основным компонентом толстых нитей является миозин. Тонкие нити состоят из *F*-актина и содержат еще два белка, принимающих участие в запуске мышечного сокращения, — *тропомиозин и тропонин*.

При отсутствии взаимодействия между миозином толстых нитей и актином тонких эти нити могут перемещаться относительно друг друга между двумя крайними состояниями (рис. 129). Одно из этих состояний предельно растянутое, при котором имеет место лишь незначительное перекрывание толстых и тонких нитей. Второе состояние — предельно сокращенное, при котором толстые нити максимально вдвинуты между тонкими и достигают своими концами *Z*-пластинки. Мышечное сокращение происходит в результате согласованного перехода саркомеров всех миофибрилл, участвующих в формировании мышцы, из предельно растянутого в полностью или частично сокращенное.

Движущей силой этого сокращения является гидролиз АТФ. При рассмотрении роли АТФ в мышечном сокращении нужно учесть важную особенность комплекса миозина с АТФ. Этот комплекс легко образуется и в нем за короткое время происходит гидролиз АТФ, но процесс на этой стадии затормаживается вследствие того, что АДФ и ортофосфат прочно удерживаются в комплексе. Быстрая

диссоциация происходит лишь после того, как произойдет взаимодействие комплекса миозин — АДФ·фосфат — актин (константы скорости диссоциации тройного комплекса в отсутствие актина составляют $0{,}05с^{-1}$, в то время как в присутствии актина — $15с^{-1}$). В результате, если возможно взаимодействие миозина и актина, должно наблюдаться достаточно быстрое попеременное возникновение контактов между ними после каждого акта гидролиза АТФ и разрушение этих контактов после диссоциации продуктов гидролиза и связывания новых молекул АТФ (рис.130).

Итогом этого является быстрое перемещение толстых нитей относительно тонких, которое приводит к сокращению мышечного волокна.

Однако в отсутствие внешнего сигнала, получаемого от нейронов, таких событий не происходит. Это связано с наличием в составе тонких нитей белка тропомиозина, который при недостаточно высоких концентрациях ионов кальция блокирует на молекулах актина центры его связывания с миозином. Лишь при подаче нервного импульса на сарколемму происходит освобождение запасов ионов кальция, находящихся в специальных цистернах саркоплазматического ретикулума (аналога эндоплазматического ретикулума) мышечных волокон. Освободившиеся ионы Ca^{2+} взаимодействуют с еще одним компонентом тонких нитей — тропонином, трехсубъединичные частицы которого регулярно располагаются на нитях *F*-актина. В этих участках под действием тропонина происходит конформационное изменение в тропомиозине, итогом которого является освобождение сайтов связывания миозина молекулами актина. В результате при наличии достаточного запаса АТФ начинается описанный выше процесс гидролиза АТФ и перемещения толстых нитей относительно тонких. После прекращения действия нервного импульса ионы кальция снова втягиваются в саркоплазматический ретикулум, молекулы тропонина возвращаются на свои исходные позиции и мышца релаксирует в свое исходное состояние.

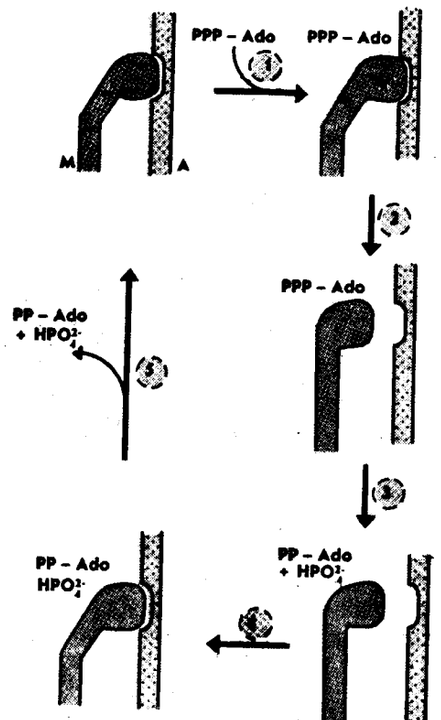


Рис. 130. Схема взаимодействия актина (А) с головкой миозина (М):

1 – присоединение АТФ к миозину; *2* – диссоциация комплекса А·М под действием АТФ; *3* – гидролиз АТФ, связанного с миозином; *4* – восстановление контакта; *5* – диссоциация АДФ и фосфата под действием актина

Приведенная картина является весьма упрощенной. Многие вопросы остаются невыясненными, в частности механизм направленного перемещения толстых нитей в сторону *Z*-пластинки. Однако она достаточно наглядно демонстрирует то основное положение, что для реализации возможностей, заложенных в актин-мио-

зиновой системе, нужен высокий уровень пространственной организации как этих двух основных, так и некоторых вспомогательных биохимических элементов мышечных клеток.

Ответы к задачам

Глава 3

3.1. При pH 3 заряд равен +4,5; при pH 7 заряд равен –1,8; при pH 10 заряд равен –5,5.

3.2. Пять гидрофобных остатков в A-цепи и 12 в B-цепи (см. рис. 31).

3.3. Так как на один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, можно представить диаграмму распределения аминокислот вдоль цепи α-спирали в виде круга, содержащего 18 секторов, каждый из которых соответствует определенной аминокислоте (рис. 131). Из диаграммы видно, что одна поверхность α-спирали оказывается полярной, а другая — гидрофобной. Такая структура своей гидрофобной областью будет легко взаимодействовать с гидрофобными липидами и в то же время ее полярная область будет обеспечивать растворимость в плазме крови.

3.4. Стабильность α-спирали определяется природой пространственно сближенных аминокислот в положениях $(i-2)$, $(i-4)$, $(i-5)$ и $(i-4-5)$, $(i-2-5)$. При замене произойдут следующие изменения:

1. При первой замене стабильность вероятнее всего не изменится, так как заменяемые аминокислотные остатки одной природы — гидрофобные.

2. Стабильность α-спирали при второй замене уменьшится, так как массивный остаток Trp вызовет стерические напряжения в укладке сближенных аминокислотных остатков.

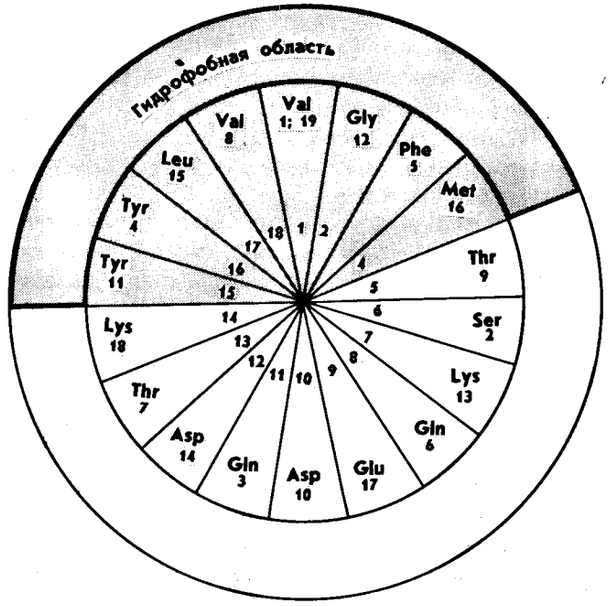


Рис. 131. К задаче 3.3

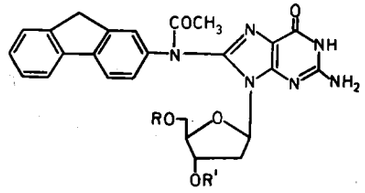
3. α-Спираль разрушится с большой вероятностью, так как наличие в положениях 1 — 4 двух массивных ароматических аминокислот вызовет сильные стерические затруднения в укладке додекапептида в α-спираль.

4. α-Спираль разрушится из-за электростатического дестабилизирующего отталкивания двух положительно заряженных аминокислот — аргинина и лизина.

5. α-Спираль стабилизируется электростатическим взаимодействием положительно заряженной аминокислоты лизина с отрицательно заряженной глютаминовой кислотой.

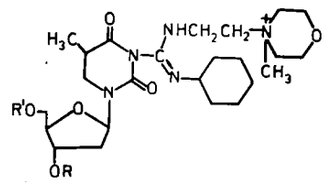
3.5. Структура тРНК, специфичной к тирозину, представлена в виде «клеверного листа» на рис. 132. Основное отличие заключается в увеличении дополнительной петли.

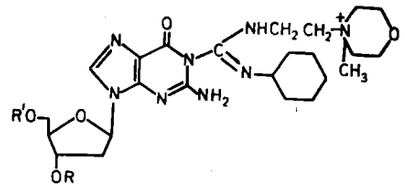
3.6. 1. Появление объемного заместителя у C8 гетероцикла вызывает переход *анти*-конформации в *син*-конформацию



что нарушает образование водородных связей в дуплексе. Это значительно снизит стабильность дуплекса.

2. Модификации будут подвергаться тимидин и гуанозин:





Эта модификация полностью нарушает образование водородных связей у T и G,а так как данный декануклеотид содержит два G и три T, то образование дуплекса невозможно.

3. При переаминировании с однозамещенным амином NH_2R возможно образование двух конформеров, один из которых сохраняет способность образовывать водородную связь. Поэтому стабильность дуплекса снизится незначительно.

При переаминировании с двузамещенным амином NHR_2 модифицированный цитозин полностью теряет способность образовывать третью водородную связь с гуанозином, при этом комплекс будет слабее.

4. У производного аденина, содержащего в положении 2 аминогруппу, появляется способность образовывать дополнительную водородную связь с тимином, т.е. пара 2-NH_2-A≡T будет образовывать три водородные связи, как и пара G≡C, что значительно увеличит стабильность дуплекса.

3.7. Бромацетальдегид и глиоксаль реагируют с гетероциклами по атомам, участвующим в образовании водородных связей в двойной спирали ДНК. Модификации аденина и гуанинов свидетельствуют о нарушении двойной спирали и образовании однонитевых структур, в которых 11-аденин и 10′- и 12′-гуанины не участвуют в образовании комплементарных пар.

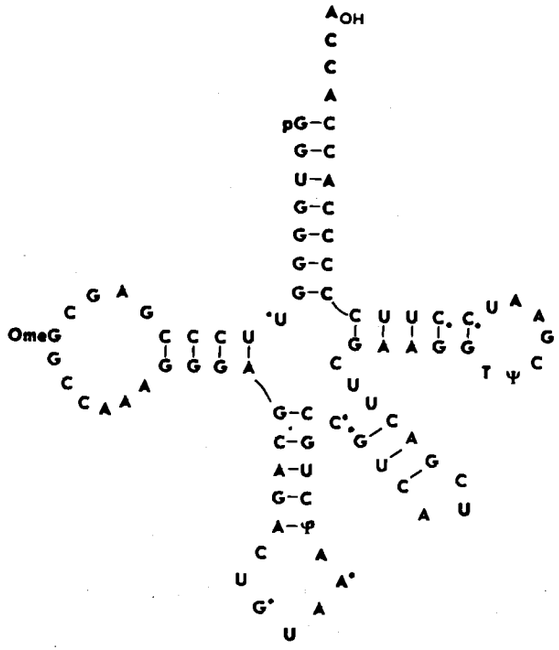


Рис. 132. К задаче 3.5

Так как данный фрагмент имеет обращенные повторы, то, очевидно, при суперспирализации образуется структура типа «крест» (рис. 133), в которой 11-аденин и 10′- и 12′-гуанины не участвуют в образовании водородных связей.

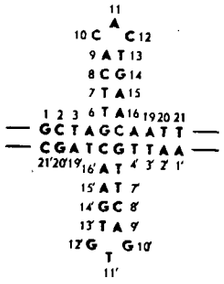


Рис. 133. К задаче 3.7

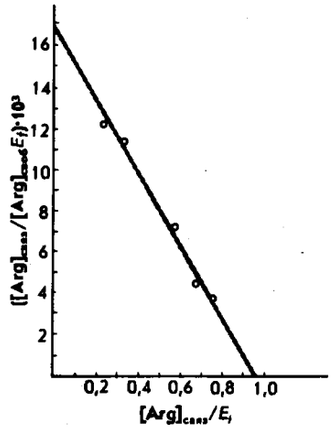


Рис. 134. К задаче 3.8

3.8. График в координатах Скэчерда представлен на рис. 134. Константа ассоциации $1{,}7\cdot10^4 M^{-1}$; число центров связывания 1.

3.9. Простейшая схема аффинной модификации биополимера P реагентом может быть записана в виде

$$P + X \rightleftharpoons PX\ (K_X),\quad PX \longrightarrow P(k).$$

Эта схема содержит четыре частицы, и, следовательно, процесс должен описываться четырьмя уравнениями. Одно из них – условие квазиравновесия

$$\frac{[P][X]}{[PX]} = K_X, \tag{1}$$

два уравнения материального баланса

$$[P] + [PX] + [PZ] = [P]_0, \tag{2}$$

$$[X] + [PX] + [PZ] = [X]_0 \tag{3}$$

и четвертое уравнение – кинетическое

$$\frac{d[PZ]}{dt} = k[PX].$$

Так как $[X]_0 \gg [P]_0$, то $[X] \approx [X]_0$. Тогда из уравнений (1) и (2) следует, что

$$[PX] = \frac{[P]_0 - [PZ]}{1 + K_X/[X]_0},$$

и кинетическое уравнение приводится к виду

$$\frac{d[PZ]}{dt} = \frac{k}{1 + K_X/[X]_0}([P]_0 - [PZ]),$$

или

$$v = \frac{k}{1 + K_X/[X]_0}([P]_0 - [PZ]).$$

Глава 4

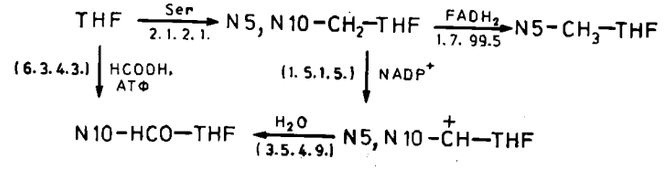
4.1. См. рис. 135.

4.2. УДФ-D-глюкуронат $\rightleftharpoons$ УДФ-L-идуронат. Фермент имеет шифр 5.1.3.12, относится к классу изомераз. Рациональное название: УДФ-глюкуронат 5′-эпимераза.

4.3. Схема синтеза 6-аминопеницилланової кислоты представлена на рис. 136. L-α-Аминоадипинат является алкилирующим агентом, отдает CO_2. На первой стадии работает синтетаза, так как происходит образование двух пептидных связей, на второй стадии – оксидоредуктаза, так как для циклизации необходимо отщепление 4 атомов водорода, на третьей стадии – гидролаза.

4.4. Схема синтеза представлена на рис. 137. Числа рядом со стрелками указывают шифр фермента, катализирующего соответствующую стадию.

4.5. Схема взаимопревращений одноуглеродных производных тетрагидрофолата имеет вид



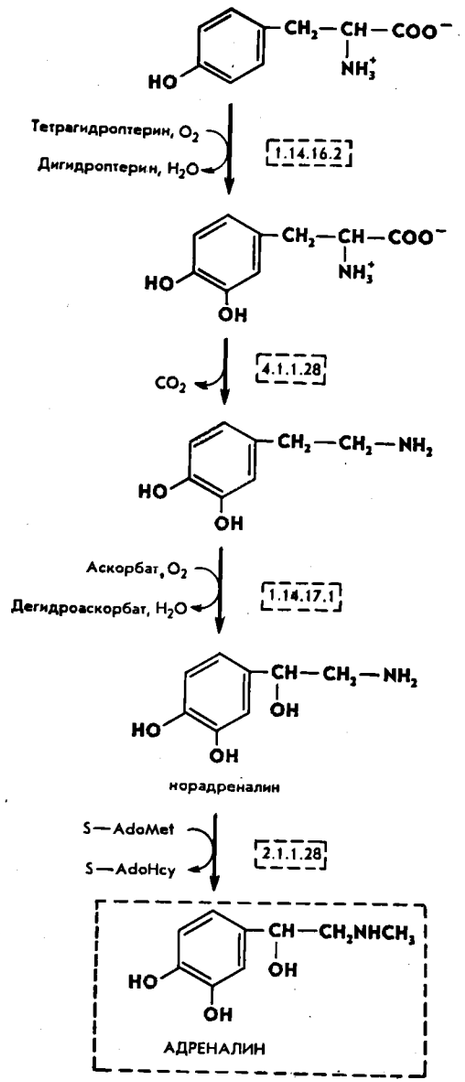


Рис. 135. К задаче 4.1

Глава 5

5.1. Если бы репликация протекала по дисперсионному механизму, то после первого удвоения результат соответствовал бы наблюдаемому и при полуконсервативном механизме, т.е. ДНК занимала бы промежуточное положение между «тяжелой» и «легкой» фракциями. Однако при втором удвоении все молекулы ДНК опять будут иметь одинаковую

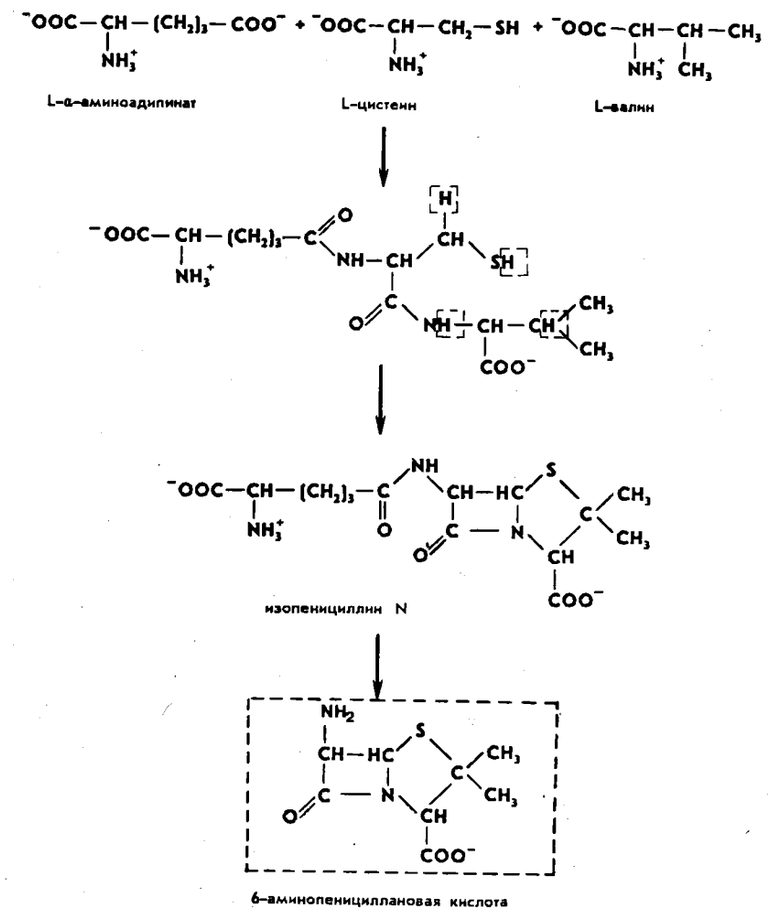


Рис. 136. К задаче 4.3

плотность и занимать промежуточное положение между полосой, наблюдаемой после первого удвоения, и полосой «легкой» ДНК.

5.2. Последовательность мРНК: 5′—GGUUGGGUUUAUGGUAGGUAAG. Последовательность аминокислот, считывающаяся с инициирующего кодона: Met—Val—Gly—Lys.

Последовательность аминокислот, оканчивающаяся кодоном-терминатором: Gly—Trp—Val—Tyr—Gly—Arg. Этот фрагмент ДНК может участвовать в кодировании аминокислотных последовательностей для двух белков со сдвигом рамки считывания.

5.3. Так как синтез белка оборвался после Ala, то это, очевидно, вызвано тем, что в мутантной ДНК вслед за кодоном Ala вместо кодона Trp (UGG) возник кодон-терминатор (UAG). Вероятно, при репликации напротив профлавина, которой не комплементарен ни одному из нуклеотидов, полимераза случайным образом встроила аденозин между T и G и возник кодон-терминатор.

5.4. 5′—GAUGAAAGUU—3′.

5.5. Так как в системе не хватает фактора транслокации G, то после синтеза первого

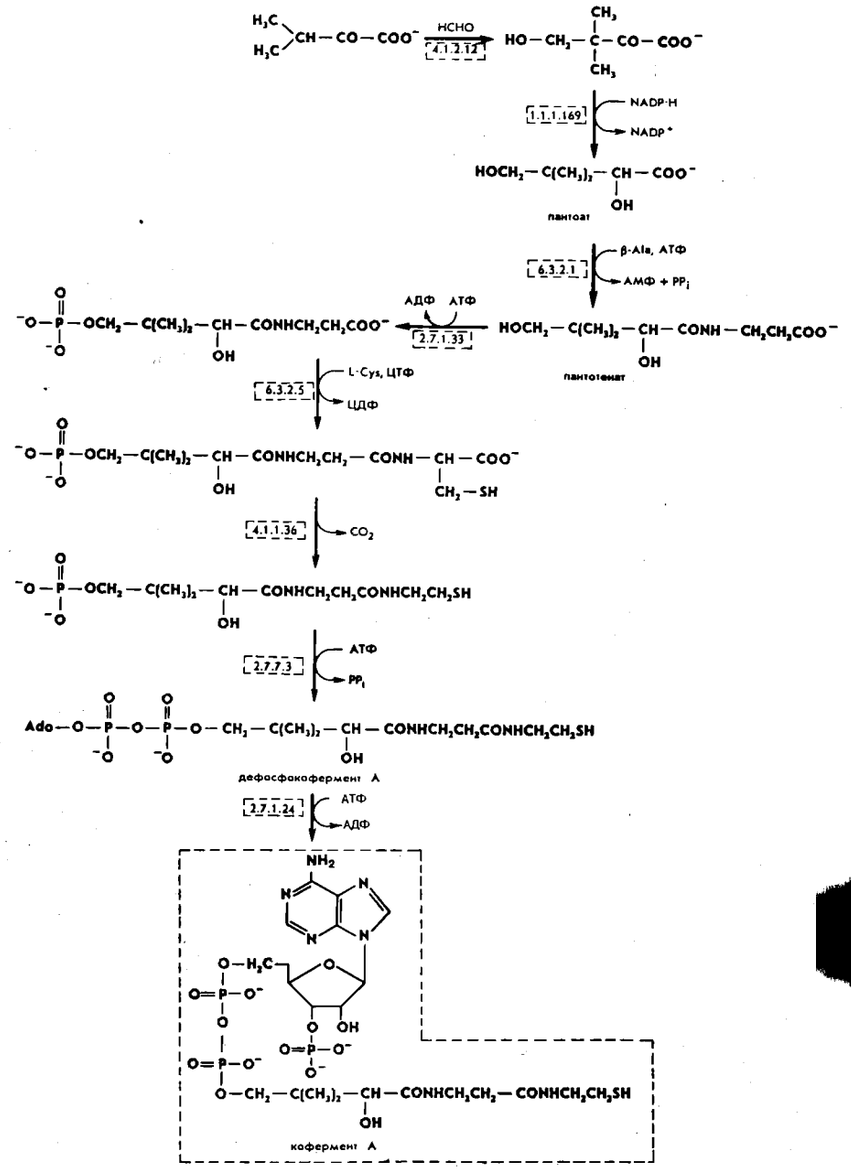


Рис. 137. К задаче 4.4

дипептида Met—Phe трансляция прекратится, причем этот пептид будет ковалентно связан с фенилаланиновой тРНК.

5.6. Сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Bam HI имеет последовательность GGATCC, которая кодирует дипептид Gly—Ser. Для того чтобы нарушить сайт узнавания, достаточно заменить один из нуклеотидов. Учитывая, что Gly кодируется четырьмя кодонами GGN, а Ser — кодоном UCN, где N – любой из четырех нуклеотидов, то достаточно

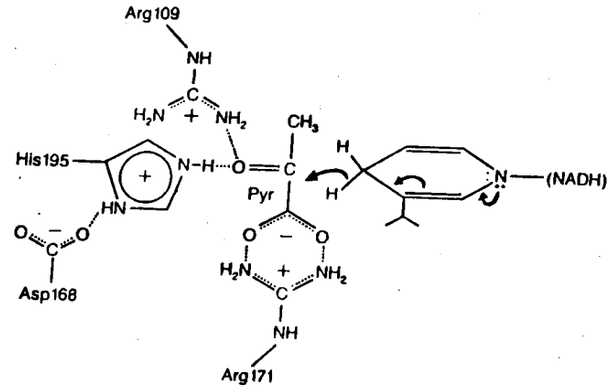


Рис. 138. К задаче 6.1

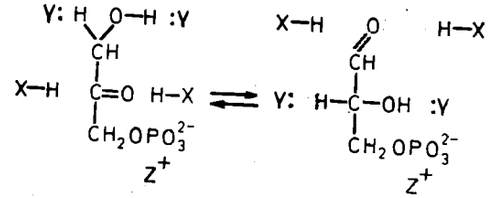
синтезировать к этой последовательности олигонуклеотид, в котором в сайте узнавания в третьем положении будет стоять U, C или G либо в шестом положении – A, U или G, и далее провести сайт-специфичный мутагенез, предварительно переклонировав этот ген в фаге M13.

5.7. Так как необходимо ввести липкие концы в фрагмент ДНК, который вставляется по сайту узнавания эндонуклеазы рестрикции EcoR1, то первым аминокислотным остатком должен быть Asn (кодон AAU). Кодон второго аминокислотного остатка должен начинаться на U, т.е. это могут быть Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp. И лишь третий аминокислотный остаток может быть любым.

Глава 6

6.1. См. рис. 138.

6.2. Гипотетическая модель работы активного центра триозофосфатизомеразы представлена на схеме



где Y – акцептор протона (Glu^-, Asp^-, Cys^-, His): X—H – донор протона (Glu, Asp, Cys, His^+); Z^+ – положительно заряженный аминокислотный остаток (Lys, Arg).

6.3 Зависимость $v - s$ представлена в координатах $s/v - s$ на рис. 139. Из графика получены значения $K_M = 2 \cdot 10^{-8}$ М, $v_{max} = 2{,}2 \cdot 10^{-6}$ М/мин.

6.4. Зависимость $1/v - 1/s$ представлена на рис. 140. Ингибирование конкурентное; $K_M = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $K_2 = 6{,}55 \cdot 10^{-4}$ М.

6.5. $v = dp/dt = V_{max}(s_0 - p)/(K_M + e_0)$; $v_0 = (dp/dt)_{p \to 0} = V_{max} s/(K_M + e_0)$.

6.6. Если ингибитор является аналогом первого субстрата S_1, то уравнение скорости реакции имеет вид

$$v = \frac{k_2\,[E]_t}{1 + \left[1 + \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)\frac{K_1}{s_1}\right]\frac{K_2}{s_2}}.$$

По отношению к обоим субстратам наблюдается конкурентный тип ингибирования. В том случае, когда ингибитор является аналогом второго субстрата S_2, выражение для скорости реакции следующее:

$$v = \frac{k_2\,[E]_t}{1 + \left(1 + \frac{K_1}{s_1} + \frac{i}{K_i}\right)\frac{K_2}{s_2}}.$$

По отношению к первому субстрату неконкурентный тип ингибирования, ко второму субстрату – конкурентный. Таким образом, по типу ингибирования аналогом субстрата можно определить порядок связывания субстратов с ферментом.

6.7. pH 7,58; pH 6,88 – 8,27.

Глава 7

7.1. Первый пик соответствует имидазолиду динуклеотида, второй – исходному динуклеотиду, третий – дизамещенному пирофосфату. Выход основного продукта реакции 60%.

7.2. $\varepsilon = 118{,}4 \cdot 10^3 м^{-1}см^{-1}$.

7.3. Связалось 2,4 о.е. олигонуклеотида; емкость сорбента 165 о.е./г.

7.4. 158 Ки/ммоль.

7.5. Калибровочная кривая представлена на рис. 141. Количество миоглобина в образцах: 22,4 мг/мл, 74,1 мг/мл, 870 мг/мл.

7.6. В первом случае расщепление осуществляли гидролитическим ферментом химотрипсином, во втором случае использовали химическое расщепление бромцианом по остаткам метионина. Белок состоит из 135 аминокислотных остатков и имеет последовательность

MAALRPLVKPKIVKKRWKKFIRHQSDRYVKIKRNWRKPRGIDNRVRRRFKGQILMPNIGYGSNKKWKHMLRSGFRK
FLVHNVKELEVLLMCNKSYCAEIAHNVSSKNRKAIVERAAQLAIRVWNPNARLRSEENE.

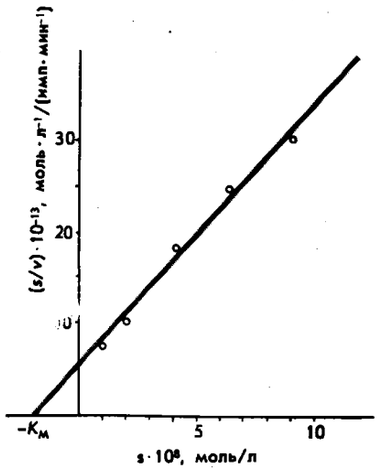


Рис. 139. К задаче 6.3

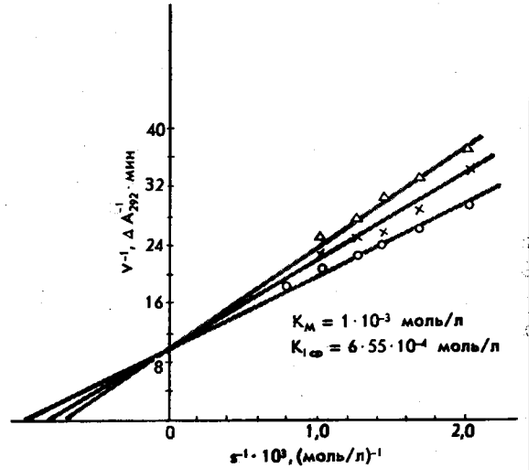


Рис. 140. К задаче 6.4

При расщеплении трипсином образуются 26 пептидов и 10 свободных аминокислот.

7.7. Калибровочная кривая представлена на рис. 142. По ней определяем молекулярную массу: первая субъединица 38 кДа, вторая субъединица 95,5 кДа.

Фермент состоит из четырех субъединиц: двух первых и двух вторых.

7.8. Молекулярная масса 33,7 кДа: $f/f_0 = 1{,}69$.

Глава 8

8.1. В равновесии концентрация дигидроксиацетонфосфата в 21,8 раза превышает концентрацию глицеральдегид-3-фосфата.

8.2. 1:0,019.

8.3. Цитохром *c* и кофермент *Q* были взяты в стехиометрическом соотношении, т.е. 2:1. АТФ $= 5{,}5 \cdot 10^{-4}$, АДФ $= 4{,}5 \cdot 10^{-4}$, [АДФ]/[АТФ] = 9:11.

8.4. 36,2%.

Глава 9

9.1. На синтез лейцина затрачивается 58 молекул АТФ, а при сгорании лейцина образуется 49 молекул АТФ.

9.2. В результате полной деструкции триптофана образуется 44 молекулы АТФ.

9.3. 78 $h\nu$.

9.4. 76 $h\nu$.

9.5. 20 молекул АТФ. Выигрыш.

9.6. а) Радиоактивная метка не обнаружится.

б) Радиоактивная метка обнаружится в 8 углеродных атомах протопорфирина: в пиррольных кольцах в α-положении к азоту и в метиленовых мостиках, соединяющих пиррольные кольца.

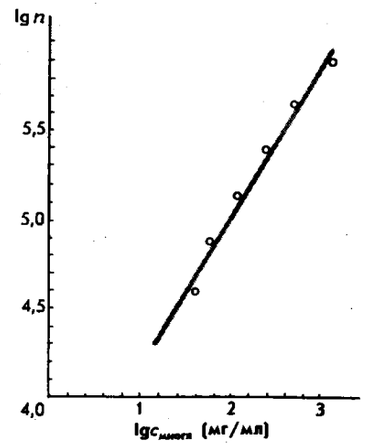


Рис. 141. К задаче 7.5

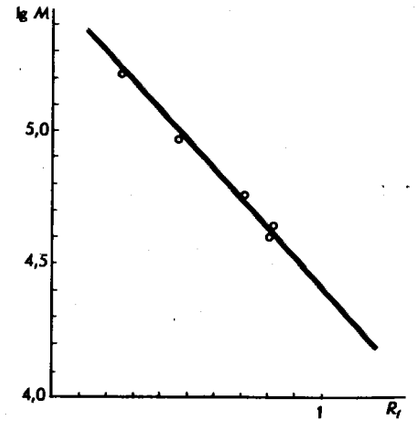


Рис. 142. К задаче 7.7

ПРИЛОЖЕНИЕ

ТАБЛИЦА ФЕРМЕНТОВ

Шифр	Название	Катализируемая реакция
	1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ	
	1.1. Действующие на CH-OH группу доноров	
	1.1.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора	
1.1.1.1	Алкоголь дегидрогеназа	(IV.1) (содержит Zn^{2+})
1.1.1.3	Гомосерин дегидрогеназа	Рис. 101, р-ция (3)
1.1.1.22	УДФ глюкоза дегидрогеназа	(IX.17)
1.1.1.23	Гистидинол дегидрогеназа	Рис. 116, р-ция (9)
1.1.1.25	Шикимат дегидрогеназа	Рис. 114, р-ция (4)
1.1.1.27	Лактат дегидрогеназа	(VIII.26)
1.1.1.31	3-Гидроксиизобутират дегидрогеназа	Рис. 117, р-ция (3б)
1.1.1.34	Гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктаза (NADP·H)	Рис. 106, р-ция (2)
1.1.1.35	3-Гидроксиацил-CoA дегидрогеназа	(VIII.36)
1.1.1.37	Малат дегидрогеназа	(VIII.49)
1.1.1.41	Изоцитрат дегидрогеназа (NAD⁺)	(VIII.45)
1.1.1.44	Фосфоглюконат дегидрогеназа (декарбоксилирующая)	(IX.11)
1.1.1.49	Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	(IX.9)
1.1.1.65	Пиридоксин 4-дегидрогеназа	Пиридоксин + $NADP^+$ ⇌ ⇌ Пиридоксаль + NADP·H
1.1.1.85	3-Изопропилмалат дегидрогеназа	Рис. 114, р-ция (4)
1.1.1.88	Гидроксиметилглутарил-CoA редуктаза	Рис. 106, р-ция (2)
1.1.1.94	Глицерин-3-фосфат дегидрогеназа (NAD (P)⁺)	Глицерин-3-фосфат + NAD(P) ⇌ ⇌ Диоксиацетон фосфат + + NAD(P)·H
1.1.1.95	Фосфоглицерат	3-Фосфоглицерат + NAD^+ ⇌ ⇌ 3-Фосфооксипируват + NAD·H
1.1.1.100	3-Кетоацил-ACP-редуктаза	(IX.23)
1.1.1.105	Ретинол дегидрогеназа	Ретинол + NAD^+ ⇌ ⇌ Ретиналь + NAD·H
1.1.1.155	Гомоизоцитрат дегидрогеназа	Рис. 113, р-ция (3)
1.1.1.169	2-Кетопантоат редуктаза	D-Пантоат + $NADP^+$ ⇌ ⇌ кетопантоат + NAD·H
1.1.1.205	ИМФ дегидрогеназа	Рис. 122, р-ция (3)

	1.1.3. С кислородом в качестве акцептора	
1.1.3.4	Глюкоза оксидаза	D-Глюкоза + O_2 ⇌ ⇌ D-Глюконо-δ-лактон (флавопротеид, FAD)
	1.2. Действующие на альдегидные кетогруппы доноров	
	1.2.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора	
1.2.1.11	Аспартатсемиальдегид дегидрогеназа	Рис. 112, р-ция (2)
1.2.1.12	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	(VIII.17), (VIII.18)
1.2.1.17	Глиоксилат дегидрогеназа (ацилирующая)	(IX.53)
1.2.1.27	Метилмалонатсемиальдегид дегидрогеназа (ацилирующая)	Рис. 117, р-ция (4б)
1.2.1.32	Аминомуконатсемиальдегид дегидрогеназа	Рис. 118, р-ция (7)
1.2.1.41	Глутаматсемиальдегид дегидрогеназа	(IX.45)
	1.2.4. С дисульфидами в качестве акцептора	
1.2.4.1	Пируват дегидрогеназа	(IV.4), R = CH_3 (содержит тиаминпирофосфат)
1.2.4.2	α-Кетоглутарат дегидрогеназа	(IV.4), R = $^-OOCCH_2$ CH_2(содержит тиаминпирофосфат)
1.2.4.4	Дегидрогеназа разветвленных α-кетокислот	(IX.70б) (содержит тиаминпирофосфат)
	1.2.7. С железосерным белком в качестве акцептора	
1.2.7.2	2-Кетобутират синтаза	(IX.67)
	1.3. Действующие на CH-CH-группу доноров	
	1.3.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора	
1.3.1.10	Еноил-ACP-редуктаза	(IX.25)
1.3.1.12	Префенат дегидрогеназа	Рис. 115, р-ция (2)
1.3.1.13	Префенат дегидрогеназа (NADP⁺)	Рис. 115, р-ция (2)
1.3.1.14	Оротат редуктаза	(IX.76 б) (флавопротеид)
1.3.1.15	Оротат редуктаза (NADP·H)	(IX.76 б) (флавопротеид)
1.3.1.26	Дигидропиколинат редуктаза	Рис. 112, р-ция (2)
	1.3.3. С кислородом в качестве акцептора	
1.3.3.3	Копропорфириноген оксидаза	Рис. 111, р-ция (5)
1.3.3.4	Протопорфириноген оксидаза	Рис. 111, р-ция (6)
	1.3.99. С другими акцепторами	
1.3.99.1	Сукцинат дегидрогеназа	(VIII.52) (флавопротеид, FAD)
1.3.99.3	Ацил-CoA дегидрогеназа	(VIII.34) (флавопротеид)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
1.3.99.7	Глутарил-CoA дегидрогеназа	Рис. 118, р-ция (10) (флавопротеид)
1.3.99.10	Изовалерил-CoA дегидрогеназа	(IX,70в) (флавопротеид)
1.3.99.12	2-Метилацил-CoA дегидрогеназа	Рис. 117, р-ция (1б) (1в)

1.4. Действующие на CH-NH_2 группу доноров

1.4.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора

1.4.1.2	Глутамат дегидрогеназа	(IX.37)
1.4.1.4	Глутамат дегидрогеназа ($NADP^+$)	(IX.37)

1.5. Действующие на CH-NH группу доноров

1.5.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора

1.5.1.2.	Пирролин-5-карбоксилат редуктаза	Рис. 110, р-ция (3)
1.5.1.3.	Тетрагидрофолат дегидрогеназа	THE + $NADP^+$ TDE + NADP·H
1 5.1.5	Метилентетрагидрофолат дегидрогеназа ($NADP^+$)	(IV.11)
1.5.1.7	Сахаропин дегидрогеназа (NAD^+, лизин образующая)	(IX.56б)
1.5.1.8	Сахаропин дегидрогеназа ($NADP^+$, лизин образующая)	(IX.56б)
1.5.1.9.	Сахаропин дегидрогеназа (NAD^+, L-глутамат образующая)	(IX.56а)
1.5.1.10	Сахаропин дегидрогеназа ($NADP^+$, L-глутамат образующая)	(IX.56а)
1.5.1.20	Метилентетрагидрофолат редуктаза (NADP·H)	(IV.12) (флавопротеид) (FAD)

1.6. Действующие на NAD·H или NADP·H

1.6.4. С дисульфидами в качестве донора

1.6.4.5	Тиоредоксин редуктаза (NADP·H)	NADP·H + тиоредоксин $\rightleftharpoons$ окисл. $\rightleftharpoons$ $NADP^+$ + тиоредоксин восст. (флавопротеид, FAD)
1.6.99.2	NAD(P)H: кофермент *Q* оксиредуктаза	NAD(P)H + кофермент *Q* → → $NAD(P)^+$ + восстановленный кофермент *Q*

1.8. Действующие на содержащие серу группы доноров

1.8.1. С NAD⁺ или NADP⁺ в качестве акцептора

1.8.1.2	Сульфит редуктаза (NADP·H)	(IX.60) (флавопротеид)

Продолжение табл.

1.8.1.3	Гипотаурин дегидрогеназа	$^-O_2SCH_2CH_2NH_3^+ + H_2O + NAD^+ \rightarrow$ $\rightarrow {}^-O_3SCH_2CH_2NH_3 + NAD\cdot H$ (гемопротеид, содержит Mo)
1.8.1.4	Дигидролипоамид дегидрогеназа	(§ 4.1) (флавопротеид, FAD)

1.8.99. С другими акцепторами

1.8.99.2	Аденилилсульфат редуктаза	(IX.58) (флавопротеид)

1.9. Действующие на гем-содержащие доноры

1.9.3. С кислородом в качестве акцептора

1.9.3.1	Цитохром *c* оксидаза	(VIII.55) (компонент цепи переноса электронов)

1.10. Действующие на дифенолы и родственные группы доноров

1.10.2. С цитохромом в качестве акцептора

1.10.2.2	Убихинон - цитохром *c* редуктаза	(VII.54) (компонент цепи переноса электронов)

1.11. Действующие на пероксид водорода в качестве акцептора

1.11.1.6	Каталаза	(1.1) (гемопротеид)
1.11.1.7	Пероксидаза	Донор + H_2O_2 → Окисленный донор + $2H_2O$ (гемопротеид)

1.13. Действующие на один донор с включением молекулярного кислорода (оксигеназы)

1.13.11. С включением двух атомов кислорода

1.13.11.5	Гомогентизат 1,2-диоксигеназа	Рис. 119, р-ция (4)
1.13.11.6	3-Гидроксиантранилат 3,4-диоксигеназа	Рис. 118, р-ция (5)
1.13.11.11	Триптофан 2,3-диоксигеназа	(IV.8)
1.13.11.20	Цистеиндиоксигеназа	(IX.72а)
1.13.11.27	4-Гидроксифенилпируват диоксигеназа	Рис. 119, р-ция (3)

1.14. Действующие на пару доноров с включением молекулярного кислорода

1.14.13. С NADH или NADP·H в качестве донора и включением одного атома кислорода

1.14.13.9	Кинуренин 3-монооксигеназа	Рис. 118, р-ция (3) (флавопротеид, FAD)

1.14.16. С восстановленным птеридином в качестве донора и включением одного атома кислорода

1.14.16.1	Фенилаланин 4-монооксигеназа	Рис. 119, р-ция (1)
1.14.16.2	Тирозин 3-монооксигеназа	Тирозин + Тетрагидроптеридин + + O_2 → 3,4-Диоксифенилаланин + + Дигидроптеридин + H_2O

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
1.14.16.4	Триптофан 5-монооксигеназа	Триптофан + Тетрагидроптеридин + O_2 → 5-Гидрокситриптофан + Дигидроптеридин + H_2O
	1.14.17. С аскорбатом в качестве донора и включением одного атома кислорода	
1.14.17.1	Дофамин β-монооксигеназа	3,4-Диоксифенилэтиламин + Аскорбат + O_2 → Норадреналин + Дегидроаскорбат + H_2O (фермент содержит Cu^{2+})
	1.15. Действующие на супероксидные радикалы в качестве акцептора	
1.15.1.1	Супероксид дисмутаза	(§ 4.1), металлопротеин (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+})
	1.17. Действующие на CH_2-группы	
	1.17.4. С дисульфидами в качестве акцептора	
1.17.4.1	Рибонуклеозид-дифосфат редуктаза	2′-dNDP + тиоредоксин$_{\text{окисл.}}$ ⇌ ⇌ rNDP + тиоредоксин$_{\text{восст.}}$ (FeS – белок)
1.17.4.2	Рибонуклеозид-трифосфат редуктора	2′-dNDP + тиоредоксин$_{\text{окисл.}}$ ⇌ ⇌ rNDP + тиоредоксин$_{\text{восст.}}$ (работает с кобамидным коферментом)
	1.18. Действующие на восстановленный ферредоксин в качестве донора	
1.18.6.1	Нитрогеназа	3 ферредоксин$_{\text{восст.}}$ + $6H^+$ + N_2 + nPPP-Ado → 3 ферредоксин$_{\text{окисл.}}$ + $2NH_3$ + *n*PP-Ado + $n NPO_3^{2-}$
	2. ТРАНСФЕРАЗЫ	
	2.1. Переносящие одноуглеродные фрагменты	
	2.1.1. Метилтрансферазы	
2.1.1.28	Норадреналин N-метилтрансфераза	S-AdoMet + Норадреналин → → S-AdoHcy + Адреналин
2.1.1.29	тРНК(цитозин-5-)-метилтрансфераза	S-AdoMet + тРНК → S-AdoHcy + + тРНК, содержащая 5-метилцитозин
2.1.1.32	тРНК (гуанин-2)-метилтрансфераза	S-AdoMet + тРНК → S-AdoHcy + + тРНК, содержащая N2-метилгуанин

Продолжение табл.

2.1.1.33	тРНК (гуанин-7-)-метилтрансфераза	S-AdoMet + тРНК → S-AdoHcy + + тРНК, содержащая 7-метилгуанин
2.1.1.34	тРНК(гуанозин-2′-)-метилтрансфераза	S-AdoMet + тРНК → S-AdoHcy + + тРНК, содержащая 2-О-метилгуанозин
2.1.1.45	Тимидилат синтаза	(IX.80)
	2.1.2. Трансферазы карбоксиметильной, формильной и родственных групп	
2.1.2.1	Серин гидроксиметилтрансфераза	(IV.10) (пиридоксалевый фермент)
2.1.2.2	Фосфорибозилглицинамид формилтрансфераза	Рис. 121, р-ция (3)
2.1.2.3	Фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид формилтрансфераза	Рис. 121, р-ция (9)
2.1.2.5	Глутамат формиминотрансфераза	Рис. 120, р-ция (5) (пиридоксалевый фермент)
2.1.2.9	Метилонил-тРНК формилтрансфераза	(V.9)
	2.1.3. Карбоксил- и карбамоилтрансферазы	
2.1.3.2	Аспартат карбамоилтрансфераза	(IX.74)
2.1.3.3	Орнитин карбамоилтрансфераза	(IX.40)
	2.2. Переносящие альдегидные или кетоостатки	
2.2.1.1	Транскетолаза	(IX.2), (IX.46) (содержит тиаминпирофосфат)
2.2.1.2	Трансальдолаза	(IX.12)
	2.3. Ацилтрансферазы	
	2.3.1. Ацилтрансферазы	
2.3.1.7	Карнитин ацетилтрансфераза	(VII.33), $x = 0$
2.3.1.9	Ацетил-CoA ацетилтрансфераза	Рис. 117, р-ция (5а)
2.3.1.15	Глицерофосфат ацилтрансфераза	(IV.16а)
2.3.1.16	Ацетил-CoA ацилтрансфераза	(VIII.37)
2.3.1.20	Диацилглицерин ацилтрансфераза	(IX.29)
2.3.1.21	Карнитин ацилтрансфераза	(VIII.33)
2.3.1.30	Серин ацетилтрансфераза	(IX.61)
2.3.1.31	Гомосерин ацетилтрансфераза	CoA-$SCOCH_3$ – Гомосерин → → CoA-SH + О-ацетилгомосерин
2.3.1.37	δ-Аминолевулинат синтаза	Рис. 111, р-ция (1а), (1б) (пиридоксалевый фермент)
2.3.1.38	ACP-Ацетилтрансфераза	(IX.19)
2.3.1.39	ACP-Малонилтрансфераза	(IX.21)
2.3.1.41	3-Кетоацил-ACP-синтаза	(IX.22)
2.3.1.46	Гомосерин сукцинилтрансфераза	CoA-$SCOCH_2CH_2COO^-$ + Гомосерин → CoA-SH + О-сукцинилгомосерин

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
2.3.1.51	1-Ацилглицерофосфат ацилтрансфераза	(IV.16б)
2.3.1.117	Тетрагидропиколинат сукцинилаза	Рис. 112, р-ция (3)

2.4. Гликозилтрансферазы

2.4.1. Гексозилтрансферазы

2.4.1.1	Фосфорилаза	(IV.18)
2.4.1.11	Гликоген (крахмал) синтаза	(IV.17)
2.4.1.13	Сахароза синтаза	(IX.14)
2.4.1.21	Крахмал синтаза	(IX.15)
2.4.1.22	Лактоза синтаза	(IX.16)
2.4.1.29	Целлюлозосинтаза (ГДФ-образующая)	ГДФ глюкоза + (1,4-β-D-глюкозил)$_n$ → ГДФ + (1,4-D-глюкозил)$_{n+1}$

2.4.2. Пентозил трансферазы

2.4.2.10	Оротат фосфорибозилтрансфераза	(IX.77а)
2.4.2.11	Никотинан фосфорибозилтрансфераза	(IV.46)
2.4.2.14	Амидофосфорибозилтрансфераза	Рис. 121, р-ция (1)
2.4.2.17	АТФ фосфорибозилтрансфераза	Рис. 116, р-ция (1)
2.4.2.18	Антранилат фосфорибозилтрансфераза	Рис. 115, р-ция (8)
2.4.2.19	Никотинат мононуклеотидпирофосфорилаза (карбоксилирующая)	Рис. 118, р-ция (13)

2.5. Переносящие алкил- или арилгруппы, другие неметильные группы

2.5.1.1	Диметилаллилтрансфераза	(IX.34)
2.5.1.6	Метионин аденозилтрансфераза	(IV.14)
2.5.1.10	Геранилтрансфераза	Геранил дисфосфат + Изопентенил дифосфат → Пирофосфат + Фарнезил дифосфат
2.5.1.16	Спермидин синтаза	(IX.49)
2.5.1.19	3-Фосфошикимат-1-карбоксивинилтрансфераза	Рис. 114, р-ция (6)
2.5.1.20	Каучук цис-полипренил цис-трансфераза	(*цис*-1,4-Изопрен)$_n$ дифосфат + + Изопентенил дифосфат → Пирофосфат + (*цис*-1,4-Изопрен)$_{n+1}$дифосфат
2.5.1.21	Пресквален синтаза	Рис. 107,р-ция (1)
2.5.1.22	Спермин синтаза	S-Аденозилметионинамин + Спермидин → 5′-Метилтиоденозин + + Спермин

2.6. Переносящие азотсодержащие группы

2.6.1. Аминотрансферазы (все ферменты этого подкласса содержат пиридоксальфосфат)

2.6.1.1	Аспартат аминотрансфераза	(IX.50)

Продолжение табл.

2.6.1.2	Аланин аминотрансфераза	(IV.19)
2.6.1.4	Глицин аминотрансфераза	(IX.52)
2.6.1.9	Гистидинол фосфат аминотрансфераза	Рис. 116, р-ция (7)
2.6.1.13	Орнитинаминотрансфераза	(IX.46)
2.6.1.17	Сукцинилдиаминопимелат аминотрансфераза	Рис. 112, р-ция (4)
2.6.1.39	2-Аминоадипат аминотрансфераза	Рис. 113, р-ция (4)
2.6.1.42	Аминотрансфераза разветвленных аминокислот	§ 9.5, схема синтеза валина и изолейцина, р-ция (5)
2.6.1.52	Фосфосерин аминотрансфераза	О-Фосфосерин + α-Кетоглутарат → → 3-О-фосфогидроксипируват + Glu
2.6.1.57	Аминотрансфераза ароматических аминокислот	Рис. 115, р-ция (4),(5)

2.7. Переносящие фосфорсодержащие группы

2.7.1. Фосфотрансферазы со спиртовой группой в качестве акцептора

2.7.1.1	Гексокиназа	(VIII.12)
2.7.1.11	6-Фосфофруктокиназа	(VI.2)
2.7.1.19	Фосфорибулокиназа	(IX.5в)
2.7.1.23	NAD$^+$ киназа	PPP-Ado + NAD$^+$ → → PPP-Ado + NADP$^+$
2.7.1.24	Дефосфо-CoA киназа	PPP-Ado + Дефосфо-CoA-SH → → PP-Ado + CoA-SH
2.7.1.25	Аденилилсульфат киназа	(IX.59)
2.7.1.26	Рибофлавин киназа	PPP-Ado + Рибофлавин → → PP-Ado + FMN
2.7.1.33	Пантотенат киназа	(IV.50)
2.7.1.35	Пиридоксаль киназа	PPP-Ado + Пиридоксаль → → PP-Ado + Пиридоксаль-5-фосфат
2.7.1.36	Мевалонат киназа	Рис. 106, р-ция (3)
2.7.1.37	Протеин киназа	PPP-Ado + Протеин → → PP-Ado + Фосфопротеин
2.7.1.38	Фосфорилаз киназа	Рис. 129, р-ция (3а)
2.7.1.40	Пируват киназа	(VIII.22)
2.7.1.67	Фосфатидилинозитол киназа	Рис. 127, р-ция (1)
2.7.1.68	Фосфатидилинозитол фосфат киназа	Рис. 127, р-ция (2)
2.7.1.71	Шикимат киназа	Рис. 117, р-ция (5)
2.7.1.107	Диацилглицерин киназа	Рис. 130, р-ция (7)

2.7.2. Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в качестве акцептора

2.7.2.3	Фосфоглицерат киназа	(IV.21)
2.7.2.4	Аспартат киназа	§ 9.5, схема биосинтеза треонина, р-ция (1)
2.7.2.11	Глутамат киназа	(IX.44)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
	2.7.3. Фосфотрансферазы с азотсодержащей группой в качестве акцептора	
2.7.3.2	Креатин киназа	(IV.22)
	2.7.4. Фосфотрансферазы с фосфатной группой в качестве акцептора	
2.7.4.2	Фосфомевалонат киназа	Рис. 106, р-ция (4)
2.7.4.3	Аденилат киназа	(IV.23)
2.7.4.4	Нуклеозидмонофосфат киназа	(IV.24а)
2.7.4.6	Нуклеозиддифосфат киназа	(IV.24б)
2.7.4.9	дТМФ киназа	PPP-Ado + P-dThd → → PP-Ado + PP-dThd
	2.7.6. Дифосфотрансферазы	
2.7.6.1	Рибозофосфат пирофосфокиназа	(IX.73)
2.7.6.2	Тиамин пирофосфокиназа	PPP-Ado + Тиамин → → P-Ado + Тиаминпирофосфат
	2.7.7. Нуклеотидилтрансферазы	
2.7.7.2	ФМН аденилилтрансфераза	PPP-Ado + FMN → PP_i + FAD
2.7.7.3	Пантетеинфосфат	PPP-Ado + Пантетеин 4′-фосфат → → PP_i + Дефосфо-CoA
2.7.7.4	Сульфат аденилилтрансфераза	(IX.57)
2.7.7.6	РНК нуклеотидилтрансфераза (РНК-полимераза)	(V.5), (V.6), работает с ДНК-матрицей
2.7.7.7	ДНК нуклеотидилтрансфераза (ДНК-полимераза)	(V.2), (V.3), работает с ДНК-матрицей
2.7.7.8	Полинуклеотид фосфорилаза	$РНК_{n+1}$ + H_3PO_4 → $РНК_n$ + Нуклеозиддифосфат
2.7.7.9	Глюкозо-1-фосфат уридилилтрансфераза	(IV.25)
2.7.7.14	Этаноламинфосфат цитидилилтрансфераза	(IV.26б)
2.7.7.15	Холинфосфат цитидилилтрансфераза	(IV.26а)
2.7.7.18	Никотинатмононуклеотид аденилилтрансфераза	(IV.47)
2.7.7.19	Полинуклеотид аденилилтрансфераза	nPPP-Ado + $(Нуклеотид)_m$ → nPP_i + + $(Нуклеотид)_m$ $(pA)_n$
2.7.7.27	Глюкозо-1-фосфат аденилилтрансфераза	(IX.13)
2.7.7.31	Терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза	(V.2)
2.7.7.34	Глюкозо-1-фосфат гуанилилтрансфераза	(IX.13)
2.7.7.41	Фосфатидат цитидилилтрансфераза	(IX.31)
2.7.7.48	РНК-зависимая РНК-полимераза	(V.5), работает с РНК-матрицей
2.7.7.49	РНК-зависимая ДНК-полимераза	(V.2), работает с РНК-матрицей

Продолжение табл.

	2.7.8. Трансферазы для других замещенных фосфатных групп	
2.7.8.1	Этаноламинфосфотрансфераза	(IX.30)
2.7.8.8	Фосфатидилсерин синтаза	(IX.32)
2.7.8.11	ЦДФ диацилглицерин: инозит 3-фосфатидилтрансфераза	Рис. 127, р-ция (9)

3. ГИДРОЛАЗЫ

3.1. Действующие на сложные эфиры

	3.1.1. Гидролазы карбоновых кислот	
3.1.1.3	Триацилглицерин липаза	Триацилглицерин + H_2O → → Диацилглицерин + Анион жирной к-ты
3.1.1.7	Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин + H_2O → → Холин + Ацетат
3.1.1.17	Глюконолактоназа	(IX.10)
	3.1.2. Гидролазы тиоловых эфиров	
3.1.2.4	3-Гидроксиизобутирил-CoA гидролаза	Рис.117, р-ция (2б)
3.1.2.10	Формил-CoA гидролаза	CoA-SC(O)H + H_2O → → CoA-SH + $HCOO^-$
	3.1.3. Гидролазы фосфомоноэфиров	
3.1.3.1	Щелочная фосфатаза	$ROPO_3^{2-}$ + H_2O → ROH + HPO_3^{2-}
3.1.3.2	Кислая фосфатаза	$ROPO_3^{2-}$ + H_2O → ROH + HPO_3^{2-}
3.1.3.3	Фосфосерин фосфатаза	O-Фосфосерин + H_2O → → Серин + HPO_3^{2-}
3.1.3.4	Фосфатидат фосфатаза	Фосфатидат + H_2O → → Диацилглицерин + HPO_3^{2-}
3.1.3.11	Фруктозо-дифосфатаза	Fru-1, 6-P_2 + H_2O → Fru 6-P + + HPO_3^{2-}
3.1.3.15	Гистидинол фосфатаза	Рис.116, р-ция (8)
3.1.3.17	Фосфатаза фосфорилаза	Рис.126, р-ция (3б)
3.1.3.25	Инозит-1-фосфатаза	Инозит-1-фосфат + H_2O → → Инозит + HPO_3^{2-}
3.1.3.37	Седогептулоза-дифосфатаза	(IX.4а)
3.1.3.56	Инозит-1,4,5,-трифосфат 5-фосфатаза	Рис. 127, р-ция (4)
3.1.3.57	Инозит-1,4-дифосфат 1-фосфатаза	Рис. 127, р-ция (5)
	3.1.4. Гидролазы фосфодиэфиров	
3.1.4.11	Трифосфоинозит фосфодиэстераза	Рис. 127, р-ция (3)
3.1.4.17	Фосфодиэстераза 3′:5′-циклического нуклеотида	Рис. 126,р-ция (2б)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
	3.1.21. Эндодезоксирибонуклеазы, продуцирующие 5′-фосфомоноэфиры	
3.1.21.1	Дезоксирибонуклеаза I	Эндонуклеотическое расщепление до 5′-фосфади- и олигонуклеотидов
3.1.21.4	Сайт-специфичные дезоксирибонуклеазы (эндонуклеазы рестрикции)	Эндонуклеолитическое расщепление ДНК с образованием специфичных двунитевых фрагментов с концевым 5′-фосфатом
	3.1.25. Сайт-специфические эндодезоксирибонуклеазы, специфичные к измененным основаниям	
3.1.25.2	Эндодезоксирибонуклеаза (апуриновая или апиримидиновая)	Расщепление вблизи апуриновых или апиримидиновых сайтов до продуктов с 5′-фосфатом
	3.1.27. Эндорибонуклеазы, образующие не 5′-фосфомоноэфиры	
3.1.27.5	Рибонуклеаза (панкреатическая)	Эндонуклеолитическое расщепление до 3′-фосфомононуклеотидов и 3′-фосфоолигонуклеотидов, оканчивающихся на Cp или Up
	3.2. Гликозидазы	
	3.2.1. Гидролизующие O-гликозиды	
3.2.1.1	α-Амилаза	Эндогидролиз 1,4-α-D-глюкозидных связей в полисахаридах, содержащих три или более 1,4-α-связанных D-глюкозных единиц
3.2.1.3	Экзо-1,4-α-D-глюкозидаза	Гидролиз концевых 1,4-связанных α-D-глюкозных остатков с высвобождением β-D-глюкозы
3.2.1.20	α-D-Глюкозидаза	Гидролиз концевых 1,4-связанных α-D-глюкозных остатков с высвобождением α-глюкозы
3.2.1.21	β-D-Галактозидаза	Гидролиз концевых β-D-галактозных остатков в β-D-галактозидах
3.2.1.26	Сахароза	Гидролиз концевых β-D-фруктофуранозидных остатков в β-D-фруктофуранозидах
	3.3. Действующие на простые эфиры	
	3.3.1. Гидролазы тиоэфиров	
3.3.1.1	Аденозилгомоцистеиназа	S-Ado-Hcy + H_2O → Ado + Hcy

Продолжение табл.

	3.4. Гидролазы пептидов	
	3.4.15. Пептидилдипептид гидролазы	
3.4.15.1	Дипептидил карбоксипептидаза	Полипептидил-дипептид + H_2O → → Полипептид + Дипептид
	3.4.16. Сериновые карбоксипептидазы	
3.4.16.2	Пролин карбоксипептидаза	Пептидилпролил-L-аминокислота + + H_2O → Пептидил-пролин + Аминокислота
	3.4.17. Металлокарбоксипептидазы	
3.4.17.1	Карбоксипептидаза А	Пептидил-L-аминокислота + + H_2O → Пептид + L-Аминокислота (содержит Zn^{2+})
	3.4.21. Сериновые протеазы	
3.4.21.1	Химотрипсин	Преимущественное расщепление по CO-группам Tyr, Trp, Phe, Leu
3.4.21.4	Трипсин	Преимущественное расщепление по CO-группам
3.4.21.7	Плазмин	Преимущественное расщепление по CO-группам Lys, Arg
3.4.21.9	Энтеропептидаза	Селективное расщепление связи Lys6-Ile7 в трипсиногене
3.4.21.36	Эластаза панкреатическая	Преимущественное расщепление по CO-группам Gly, Ala, Val, Leu, Ile
	3.4.23. Карбоксильные (жирные) протеазы	
3.4.23.1	Пепсин А	Преимущественное расщепление по CO-группам Phe, Leu
3.4.23.15	Ренин	Селективное расщепление связи Leu-Leu в ангиотензиногене
	3.5. Действующие на азот – углеродные связи (не пептидные)	
	3.5.1. В линейных амидах	
3.5.1.1	Аспарагиназа	Asn + H_2O → Asp + NH_4^+
3.5.1.2	Глутаминаза	Gln + H_2O → Glu + NH_4^+
3.5.1.9	Формилкинурениназа	Рис. 118, р-ция (2)
3.5.1.11	Пенициллин амидаза	(IV.53)
	3.5.2. В циклических амидах	
3.5.2.3	Дигидрооротаза	(IX.76a)
3.5.2.7	Имидазолонпропионаза	Рис. 120, р-ция (3)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
	3.5.3. В линейных амидинах	
3.5.3.1	Аргиназа	(IX.43)
3.5.3.8	Формиминоглутамаза	Рис. 120, р-ция (4)
3.5.4.9	Метенилтетрагидрофолат циклогидролаза	N5, N10-$\overset{+}{C}$H-THF + H_2O → → N10-CHO-THF
3.5.4.10	ИМФ циклогидролаза	Рис. 124, р-ция (10)
3.5.4.19	Фосфорибозил - АМФ циклогидролаза	Рис. 116, р-ция (3)
	3.6. Действующие на кислые ангидриды	
	3.6.1. В фосфорилсодержащих ангидридах	
3.6.1.23	Дезоксиуридинтрифосфатаза	PPP-dUrd + H_2O → → P-dUrd + PP_i
3.6.1.31	Фосфорибозил-АТФ пирофосфатаза	Рис. 116, р-ция (2)
3.6.1.32	Миозин АТФаза	PPP-Ado + H_2O → → PP-Ado + HPO_3^{2-}
3.6.1.34	H^+-переносящая АТФаза	PPP-Ado + H_2O → → PP-Ado + HPO_3^{2-}
3.6.1.37	Na^+/K^+-переносящая АТФаза	PPP-Ado + H_2O → → PP-Ado + HPO_3^{2-}
	3.7. Действующие на углерод-углерод связи	
	3.7.1. В кетосоединениях	
3.7.1.2	Фумарилацетоацетаза	Рис. 119, р-ция (6)
3.7.1.3	Кинурениназа	Рис. 118, р-ция (4) (содержит пиридоксальфосфат)
	4. ЛИАЗЫ	
	4.1. Углерод – углерод лиазы	
	4.1.1. Карбоксилазы	
4.1.1.1	Пируват декарбоксилаза	(IV.28) (содержит тиаминпирофосфат)
4.1.1.3	Оксалоацетат декарбоксилаза	(VIII.57)
4.1.1.8	Оксалил-CoA декарбоксилаза	Оксалил-Соа → формил-CoA + + CO_2 (содержит тиаминпирофосфат)
4.1.1.15	Глутамат декарбоксилаза	Глутамат → 4-Аминобутират + CO_2 (пиридоксалевый фермент)
4.1.1.17	Орнитин декарбоксилаза	(IX.47) (пиридоксалевый фермент)

Продолжение табл.

4.1.1.20	Диаминопимелинат декарбоксилаза	(IX.55) (пиридоксалевый фермент)
4.1.1.21	Фосфорибозиламиноимидазол карбоксилаза	Рис. 121, р-ция (6)
4.1.1.22	Гистидит декарбоксилаза	Гистидин → Гистамин + CO_2 (пиридоксалевый фермент)
4.1.1.23	Оротидин-5′-фосфат декарбоксилаза	(IX.77б)
4.1.1.28	Декарбоксилаза ароматической аминокислоты	Триптофан → Триптамин + CO_2 (пиридоксалевый фермент)
4.1.1.29	Цистеинсульфинат декарбоксилаза	Цистеин сульфинат → Гипотаурин + CO_2 (пиридоксалевый фермент)
4.1.1.33	Пирофосфомевалонат декарбоксилаза	Рис. 106, р-ция (5)
4.1.1.36	Фосфопантотеноилцистеин декарбоксилаза	(IV. 52)
4.1.1.37	Уропорфириноген III декарбоксилаза	Рис. 111, р-ция (4)
4.1.1.39	Рибулозодифосфат карбоксилаза	(IX.1) (содержит Cu^{2+})
4.1.1.45	Аминокарбоксимуконатсемиальдегид декарбоксилаза	Рис. 118, р-ция, (6)
4.1.1.48	Индол-3-глицеринфосфат синтаза	Рис. 115,р-ция (10)
4.1.1.49	Фосфоенолпируват карбоксикиназа (АТФ)	(IX.7)
4.1.1.50	Аденозилметионин декарбоксилаза	(IX.48)
4.1.1.65	Фосфатидилсерин декарбоксилаза	(IX.33) (пиридоксалевый фермент)
	4.1.2. Альдегид-лиазы	
4.1.2.12	Кетопантоальдолаза	2-Кетопантоат (2-кето-3,3-диметил-4-оксибутират) ⇌ α-Кетоизовалериат + CH_2O
4.1.2.13	Фруктозо-дифосфат альдолаза	(IV.31)
4.1.2.15	Фосфо-2-кето-3-дезоксигептонат альдолаза	Рис. 114, р-ция (1)
	4.1.3. Лиазы кето-кислот	
4.1.3.4	Гидроксиметилглутарил-CoA лиаза	Рис. 117, р-ция (3а)
4.1.3.5	Гидроксиметилглутарил-CoA синтаза	Рис. 106,р-ция (1)
4.1.3.7	Цитратсинтаза	(IV.32)
4.1.3.12	2-Изопропилмалат синтаза	§ 9.5, схема биосинтеза лейцина, р-ция (1)
4.1.3.18	Ацетолактат синтаза	§ 9.5, схема синтеза валина и изолейцина, р-ция (1) (флавопротеид,содержит тиаминпирофосфат)
4.1.3.21	Гомоцитрат синтаза	Рис. 113,р-ция (1)
4.1.3.27	Антранилат синтаза	Рис. 115, р-ция (7)
	4.2. Углерод-кислород-лиазы	
	4.2.1. Гидро-лиазы	
4.2.1.1	Карбоангидраза	(IV.27) (содержит Zn^{2+})
4.2.1.2	Фумарат гидратаза	(IV.33)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
4.2.1.3	Аконитат гидратаза	(IV.39)
4.2.1.9	Дегидратаза диоксикислот	§ 9.5, схема синтеза валина и изолейцина, р-ция (4)
4.2.1.10	3-Дегидрохинат дегидратаза	Рис. 114, р-ция (3)
4.2.1.11	Енолаза	(VIII.21)
4.2.1.16	Треонин дегидратаза	§ 9.5, схема синтеза треонина, р-ция (5) (пиридоксалевый фермент)
4.2.1.17	Енол-СоА гидратаза	(VIII.35)
4.2.1.18	Метилглутаконил-СоА гидратаза	Рис. 117, р-ция (2а)
4.2.1.19	Имидазолглицерин-фосфат дегидратаза	Рис. 116, р-ция (6)
4.2.1.20	Триптофан синтаза	Рис. 115, р-ция (11) (пиридоксалевый фермент)
4.2.1.22	Цистатионин β-синтаза	(IX.65) (пиридоксалевый фермент)
4.2.1.24	Порфобилиноген синтаза	Рис. 111, р-ция (2)
4.2.1.33	3-Изопропилмалат дегидратаза	§ 9.5, схема биосинтеза лейцина, р-ции (2), (3)
4.2.1.36	Гомоаконитат гидратаза	Рис. 113, р-ции (2а), (2б)
4.2.1.49	Уроканат гидратаза	Рис. 120, р-ция (2)
4.2.1.51	Префенат дегидратаза	Рис. 115, р-ция (3)
4.2.1.52	Дигидродипиколинат синтаза	Рис. 112, р-ции (1а), (1б)
4.2.1.58	Кротонил-ACP-гидратаза	(IX. 24)
4.2.1.59	3-Оксиоктаноил-ACP-дегидратаза	3-Оксиоктаноил-ACP → 2-Октеноил-ACP + H_2O
4.2.1.75	Уропорфириноген синтаза	Рис. 111, р-ция (3)

4.2.99. Другие углерод-кислород-лиазы

4.2.99.8	О-Ацетилсерин (тиол)-лиаза	(IX.62) (пиридоксалевый фермент)
4.2.99.9	О-Сукцинилгомосерин (тиол)-лиаза	(IX.63) R = $CH_2CH_2COO^-$ (пиридоксалевый фермент)
4.2.99.10	О-Ацетилгомосерин (тиол)-лиаза	(IX.63) R = CH_3

4.3. Углерод-азот-лиазы

4.3.1. Аммиак-лиазы

4.3.1.1	Аспартат аммиак-лиаза	(IX.38)
4.3.1.3	Гистидин аммиак-лиаза	Рис. 120, р-ция (1)
4.3.1.4	Формиминотетрагидрофолат циклодезаминаза	Рис. 120, р-ция (6)
4.3.1.8	Уропорфириноген синтаза	Рис. 111, р-ция (3)

4.3.2. Амидин-лиазы

4.3.2.1	Аргининосукцинат лиаза	(IX.42)
4.3.2.2.	Аденилсукцинат лиаза	Рис. 121, р-ция (8) Рис. 122, р-ция (2)

Продолжение табл.

4.4. Углерод-сера-лиазы

4.4.1.1	Цистатионин γ-лиаза (гомосерин дегидратаза)	(IX.66), § 9.5, схема синтеза треонина, р-ция (4) (пиридоксалевый фермент)
4.4.1.8	Цистатионин β-лиаза	(IX.64) (пиридоксалевый фермент)

4.6. Фосфор-кислород-лиазы

4.6.1.1	Аденилат циклаза	(IV.34)
4.6.1.4	Хоризмат синтаза	Рис. 114, р-ция (7)

5. ИЗОМЕРАЗЫ

5.1. Рацемазы и эпимеразы

5.1.1. Действующие на аминокислоты и их производные

5.1.1.7	Диаминопимелинат эпимераза	Рис. 112, р-ция (5)

5.1.3. Действующие на углеводы и производные

5.1.3.1	Рибулозофосфат 3-эпимераза	(IV.35)
5.1.3.2	УДФ-глюкоза-4-эпимераза	(IV.36)
5.1.3.12	УДФ-глюкуронат-5′-эпимераза	(IX.18) (содержит NAD^+)

5.2. Цис-транс-изомеразы

5.2.1.2	Малеилацетоацетат изомераза	Рис.119, р-ция (5)

5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

5.3.1. Катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз

5.3.1.1	Триозофосфат изомераза	(VIII.16)
5.3.1.5	Ксилоза изомераза	Ксилоза $\rightleftharpoons$ Ксилулоза Глюкоза $\rightleftharpoons$ Фруктоза
5.3.1.6	Рибозофосфат изомераза	(IX.5б)
5.3.1.9	Глюкозофосфат изомераза	(IV.37)
5.3.1.16	N-(5′-Фосфорибозилформимино) 5-Амино-1(5″-фосфорибозил)-4-имидазолкарбоксамид изомераза	Рис. 116, р-ция (4)

5.3.3. Перемещающие C=C связи

5.3.3.2	Изопентенилдифосфат Δ-Изомераза	Рис.106, р-ция (6)

5.4. Внутримолекулярные трансферазы

5.4.2. Фосфотрансферазы

5.4.2.1	Фосфоглицерат мутаза	(VIII.20)
5.4.2.2	Фосфоглюкомутаза	(IV.40) (для эффективной работы необходим глюкозо-1,6-дифосфат)

Продолжение табл.

Шифр	Название	Катализируемая реакция
	5.4.99. Перемещающие другие группы	
5.4. 99.2	Метилмалонил-CoA мутаза	(IV.38) (необходим кобамидный кофермент)
5.4.99.3	2-Ацетолактат мутаза	§ 9.5, схема синтеза валина и изолейцина, р-ция (2)
5.4.99.5	Хоризмат мутаза	Рис.115, р-ция (1)
5.4.99.7	Ланостерин синтаза	2,3-Эпоксисквален → ланостерин
	5.99. Другие изомеразы	
5.99.1.3	ДНК-топоизомераза (АТФ-гидролизующая)	В присутствии АТФ катализирует расщепление, взаимное перемещение и восстановление разрывов в двунитевой ДНК
	6. ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ)	
	6.1. Образующие углерод-кислород-связи	
	6.1.1. Лигазы, образующие аминоацил-тРНК и родственные соединения	
6.1.1.1-7	Аминоацил-тРНК синтетазы	(IV.41), Tyr, Trp, Thr, Leu, Ile, Lys, Ala
6.1.1.9-12		Val, Met, Ser, Asp
6.1.1.14-22		Gly, Pro, Cys, Glu, Gln, Arq, Phe, His, Asn
	6.2. Образующие связи углерод-сера	
	6.2.1. Лигазы кислота-тиол	
6.2.1.3	Ацил-CoA синтетаза	(IV.42)
6.2.1.4	Сукцинил-CoA синтетаза (ГДФ-образующая)	(IX.54)
6.2.1.16	Ацетоацетат-CoA синтетаза	Рис.117, р-ция (4)
	6.3. Образующие связи углерод-азот	
	6.3.1. Амид синтетазы	
6.3.1.1	Аспарагин синтетаза	(IX.51)
6.3.1.2	Глутамин синтетаза	(IX.36)
6.3.1.5	NAD^+ синтетаза	(IV.48)
	6.3.2. Синтетазы пептидов	
6.3.2.1	Пантотенат синтетаза	PPP-Ado + 2,4-Дигидрокси-3,3-диметилбутират + β-Ala → P-Ado + + PP_i + пантотенат

Продолжение табл.

6.3.2.5	Фосфопантотеноилцистеин синтетаза	(IV.51)
6.3.2.6	Фосфорибозиламиноимидазолсукцинокарбоксамид синтетаза	Рис. 121, р-ция (7)
	6.3.3. Цикло-лигазы	
6.3.3.1	Фосфорибозиламиноимидазол синтетаза	Рис. 124, р-ция (5)
	6.3.4. Другие углерод-азот-лигазы	
6.3.4.1	ГМФ синтетаза	Рис. 122,р-ция (4)
6.3.4.2	ЦТФ синтетаза	(IV.43)
6.3.4.3	Формилтетрагидрофолат синтетаза	(IX.54)
6.3.4.4	Аденилосукцинат синтетаза	Рис. 122 р-ция (1)
6.3.4.5	Аргининосукцинат синтетаза	(IX.41)
6.3.4.13	Фосфорибозилглицинамид синтетаза	Рис. 121, р-ция (2)
6.3.4.16	Карбамоилфосфат синтетаза (NH_3)	(IX.39)
	6.3.5. Углерод-азот-лигазы с глутамином в качестве амидо-N-донора	
6.3.5.1	NAD^+ синтетаза (гидролизующая глутамин)	(IV.49)
6.3.5.2	ГМФ синтетаза (гидролизующая глутамин)	Рис. 122, р-ция (4)
6.3.5.3	Фосфорибозилформилглицинамид синтетаза	Рис. 124, р-ция (4)
6.3.5.5	Карбамоилфосфат синтетаза (гидролизующая глутамин)	(IX.75)
	6.4. Образующие связи углерод-углерод	
6.4.1.1	Пируват карбоксилаза	(IV.44) (содержит биотин и Mn^{2+} или Zn^{2+})
6.4.1.2	Ацетил-CoA карбоксилаза	(IX.20) (содержит биотин)
6.4.1.3	Пропионил-CoA карбоксилаза (АТФ-гидролизующая)	(VIII.41) (содержит биотин)
6.4.1.4	Метилкротонил-CoA карбоксилаза	Рис. 117, р-ция (1а) (содержит биотин)
	6.5. Образующие фосфоэфирные связи	
6.5.1.1	Полидезоксирибонуклеотид синтетаза (АТФ) (ДНК-лигаза)	(V.4)
6.5.1.2	Полидезоксирибонуклеотид синтетаза (NAD^+) (ДНК-лигаза)	(V.4)
6.5.1.3	Полирибонуклеотид синтетаза (АТФ) (РНК-лигаза)	(IV.45)

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

ОБЩАЯ

Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. – М.: Мир, 1987.

Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Т.1–2. – М.: Мир, 1986.

Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 1–3. – М.: Мир, 1985.

Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. Т. 1–2. – М.: Мир, 1993.

Мецлер Д. Биохимия. Т.1–3. – М.: Мир, 1980.

Страйер Л. Биохимия. Т.1–3. – М.: Мир, 1984.

Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. Т. 1–3. – М.: Мир, 1981.

К ГЛАВЕ 1 – 2

Албертс Б., Брей Д., Льюис Ж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т. 1–3. М.: Мир, 1994.

Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.

К ГЛАВЕ 3

Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987.

Вологодский А.В. Топология и физические свойства кольцевых ДНК. – М.: Наука,1988.

Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия. Т. 1–3. – М.: Мир,1984.

Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.

К ГЛАВЕ 4, 6

Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1–3. – М.: Мир, 1982.

К ГЛАВЕ 5

Льюин Б. Гены. – М.: Мир, 1987.

Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. – М.: Высшая школа, 1986.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. – М.: Мир, 1986.

К ГЛАВЕ 7

Аффинная модификация биополимеров/ Под ред. Д.Г.Кнорре. – Новосибирск: Наука, 1983.

Гекселер К., Экштайн Э.Аналитические и препаративные лабораторные методы. – М.: Химия, 1994.

Кнорре Д.Г., Крылова Л.Ф., Музыкантов В.С.Физическая химия. – М.: Высшая школа, 1981.

Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеоновых кислот: электрофорез и центрифугирование. – М.: Наука, 1981.

Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.

Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука,1985.

Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. – М.: Химия,1978.

К ГЛАВЕ 8 — 9

Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984.

Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. – М.: Мир, 1985.

Фотосинтез/ Под ред. Говинджи Орт Д., Т.1–2. – М.: Мир, 1987.

К ГЛАВЕ 10

Рязанов А.Г., Спирин А.С. Компартментализация биохимических процессов на полирибосомах и других субклеточных структурах. – Усп. биол. хим. 1988, С. 3–43.