

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

**БИОХИМИЯ
Конспект лекций
Модуль 2
Структурная биохимия**

Учебно-методическое пособие

Киров

2011

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Бессолицына Е. А.

К

Биохимия конспект лекций модуль 2 «Структурная биохимия»: учебно-методическое пособие / Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 146 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Биохимия».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Углеводы

Углеводы широко представлены в растениях и животных, где они выполняют как структурные, так и метаболические функции. В растениях в процессе фотосинтеза из углекислого газа и воды синтезируется глюкоза, которая далее запасается в виде крахмала или превращается в целлюлозу— структурную основу растений. Животные способны синтезировать ряд углеводов из жиров и белков, но большая часть углеводов поступает с пищей растительного происхождения.

Классификация углеводов

Углеводы — это альдегидные или кетонные производные полиатомных (содержащих более одной ОН-группы) спиртов или как соединения, при гидролизе которых образуются эти производные.

Их можно классифицировать следующим образом:

1. Моносахариды — углеводы, которые не могут быть гидролизованы до более простых форм. Их можно подразделить на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и октозы в зависимости от числа содержащихся в их молекуле атомов углерода; их можно разделить также на альдозы и кетозы в зависимости от присутствия альдегидной или кетонной группы.
2. Дисахариды при гидролизе дают две молекулы моносахарида (одинаковых или различных).
3. Олигосахариды при гидролизе дают 3—6 моносахаридов или что чаще полисахариды, в состав которых входит несколько десятков моносахаридных остатков.
4. Полисахариды дают при гидролизе более 6 молекул моносахаридов. Они могут быть линейными или разветвленными. Примерами служат крахмал и декстрины. Иногда их называют гексозанами или пентозанами, а также гомополисахаридами или гетерополисахаридами—в зависимости от того, идентичные или неидентичные моносахариды образуются при их гидролизе.

Моносахариды

Моносахариды — углеводы, которые не могут быть гидролизованы до более простых форм. Их можно подразделить на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и октозы в зависимости от числа содержащихся в их молекуле атомов углерода; их можно разделить также на альдозы и кетозы в зависимости от присутствия альдегидной или кетонной группы. Отсчет атомов углерода начинают либо от входящего в состав альдегидной группы (первый атом), либо от ближайшего к кетонной группе.

Изомерия моносахаридов.

Соединения, имеющие одну и ту же структурную формулу, но различающиеся по пространственной конфигурации, называются стереоизомерами. Образование таких изомеров оказывается возможным при вхождении в состав молекулы асимметрических атомов углерода (к которым присоединены четыре различных атома или группы). Число возможных изомеров данного соединения зависит от числа асимметрических атомов углерода (n) и равно 2^n . Глюкоза с четырьмя асимметрическими атомами углерода имеет, следовательно, 16 изомеров. Ниже указаны наиболее важные типы изомеров глюкозы.

1. Стереоизомерия или D и L изоформы:

В многих молекулах есть атом углерода с которым связаны четыре различные группировки, и такую молекулу можно представить как молекулу метана, в виде тетраэдра, в вершинах которого располагаются группировки. Такой атом называется хиральным и принадлежность к D или L форме определяется

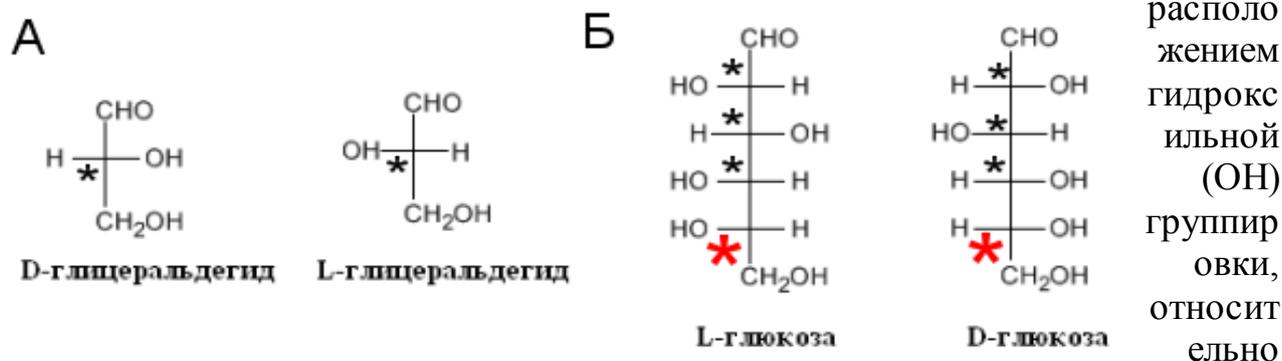
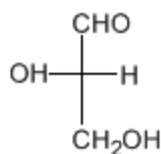


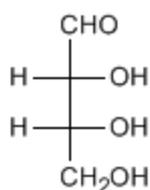
Рисунок 1: Структурные формулы стереоизомеров углеводов, * - хиральный атом, отмечены асимметрические (хиральные) атомы. А - глицероальдегид * - отмечен асимметрический атом, определяющий принадлежность к D или L форме, Б - стереоизомеры глюкозы, красной * отмечены асимметрические атомы углерода, определяющие принадлежность к стереоизомерам

то это L-форма, если справа, то D-форма. Но полностью этому правилу соответствует только глицероальдегид, имеющий только один хиральный атом (смотри рис 1 А). Во всех других углеводах хиральных атомов несколько, и каждый из них может быть признан для определения принадлежности к одной из форм стереоизомеров. Тогда было сделано решение признать атомом, определяющим стереоизомерию, последний хиральный атом молекулы (предпоследний атом углерода в молекуле). Но изменение положения гидроксильной группы только у данного атома углерода не приведет к образованию полностью зеркального отображения, что является основным условием для существования двух форм стереоизомеров. Поэтому появилось понятие ряда углеводов, то есть все углеводы могут быть выведены или синтезированы из минимального углевода (триозы), и следовательно эта триоза является предшественником или родительским соединением, так как

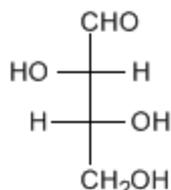
единственная триоза, обладающая оптическими свойствами, - глицероальдегид, то именно эта молекула является родительским соединением для всех остальных. В ходе синтеза углеводов с большим числом атомов, присоединение каждого следующего атома углерода



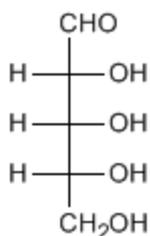
D-глицеральдегид



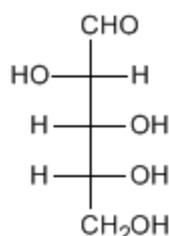
D-эритроза



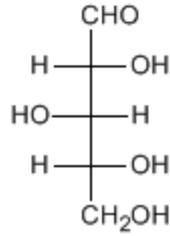
D-треоза



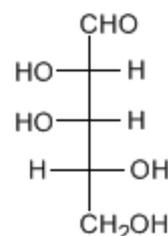
D-рибоза



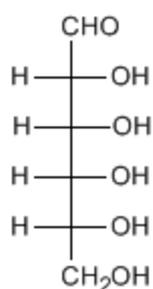
D-арабиноза



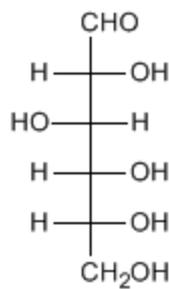
D-ксилоза



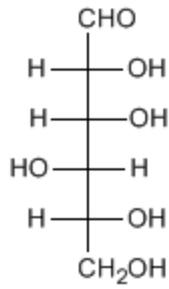
D-диксоза



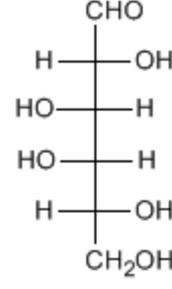
D-иллоза



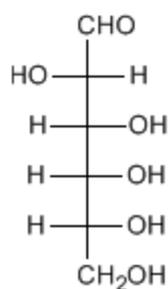
D-глюкоза



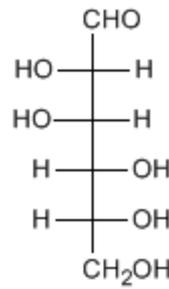
D-гулоза



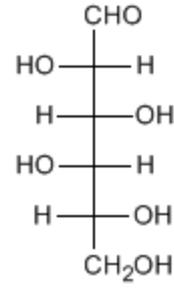
D-галактоза



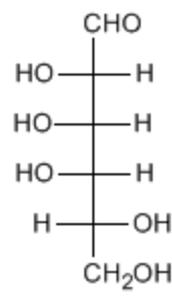
D-альтроза



D-манноза



D-идоза



D-галактоза

происходит по альдегидной группе и следовательно, хиральный атом родительского соединения оказывается все дальше от первого атома углерода, то есть остается последним асимметричным или просто предпоследним атомом углерода (смотри рисунок 2).

Присутствие асимметричных атомов углерода является причиной оптической активности соединения. Если пучок плоскополяризованного света проходит

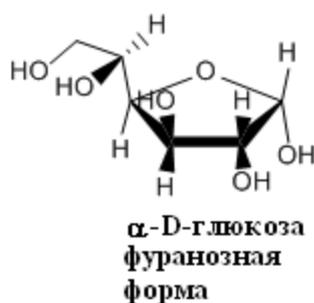
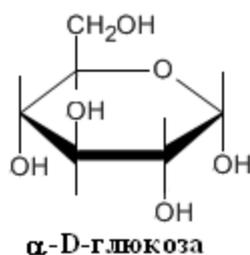
Рисунок 2: Структура D ряда углеводов

Присутствие асимметричных атомов углерода является причиной оптической активности соединения. Если пучок плоскополяризованного света проходит

через раствор оптического изомера, плоскость поляризации света поворачивается либо вправо (правовращающий изомер, +), либо влево (левовращающий изомер, -). Соединение обозначают D(—), D(+), L(—) или L(+); это обозначение показывает наличие структурного родства с D- или L-глицеральдегидом, но не обязательно тот же знак оптического вращения. Например, природной формой фруктозы является D(—)-изомер. Если D- и L-изомеры присутствуют в равных количествах, их смесь не проявляет оптической активности— активности изомеров компенсируют одна другую. Такие смеси называют **рацемическими (или DL-смесями)**. Соединения, получаемые синтетическим путем, оказываются рацемическими, поскольку в этом случае вероятности образования каждого из изомеров одинаковы.

2. Пиранозные и фуранозные кольцевые структуры.

Альдегидные или кетонные группировки легко реагируют со спиртовыми, образуя полуацетальные или полукетальные группировки, чаще всего это



происходит внутри молекулы, и следовательно происходит циклизация моносахарида, в результате образуется модифицированный гетероцикл, содержащий атом кислорода. Наиболее устойчивы пяти и шестичленные циклы. Пятичленные циклы углеводов сходны с молекулой фурана, поэтому это фуранозная форма,

Рисунок 3: Пиранозные фуранозные формы углеводов

шестичленные с молекулой пирана — пиранозная форма (смотри рисунок 3). Все гидроксильные группы, расположенные справа оказываются под циклом, а те что слева над циклом. Кольцевую структуру могут принимать и кетозы (например, D-фруктофураноза или D-фруктопираноза). В растворе глюкозы более 99% молекул находится в пиранозной форме и менее 1 % — в фуранозной форме.

3. α - и β -аномеры. При циклизации образуется гидроксильная группа при

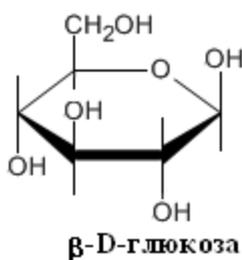
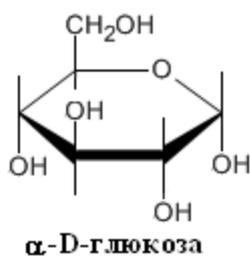


Рисунок 4: Структурные формулы аномеров глюкозы

положения альдегидного и кетонного атома углерода, что приводит к образованию смеси α - глюкопиранозы (36%) и β - глюкопиранозы (63%); оставшийся 1% представлен в основном α - и β - аномерами глюкофуранозы.

полуацетальной или полукетальной группировке, полуацетальный или полукетальный гидроксил, эта группа может располагаться под циклом, в результате образуется α -аномер, а может располагаться над циклом, тогда образуется β -аномер. Циклическая структура сохраняется и в растворе, но при этом происходит образование изомеров относительно

Описанное выше установление равновесия сопровождается так называемой мутаротацией: полуацетальное кольцо раскрывается и вновь замыкается, при этом может изменяться положение групп —Н и —ОН при углероде 1. Предполагают, что в ходе этого процесса образуется промежуточная гидратированная линейная (ациклическая) молекула, хотя по данным полярографии на долю ациклической формы глюкозы приходится всего 0,0025%. В растворе глюкоза является правовращающей; этим объясняется еще одно ее название — декстроза (декстро — правый), часто употребляемое в клинической практике.

4. **Эпимеры.** Изомеры, различающиеся по конфигурации положением групп —Н и —ОН при асимметричных атомах углерода, которые не связаны с

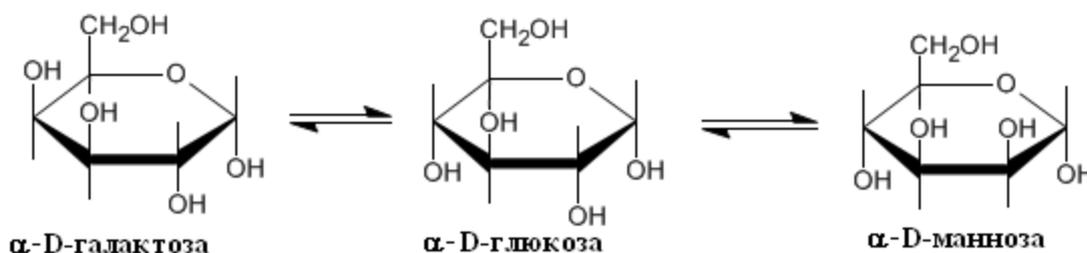


Рисунок 5: Эпимеризация глюкозы

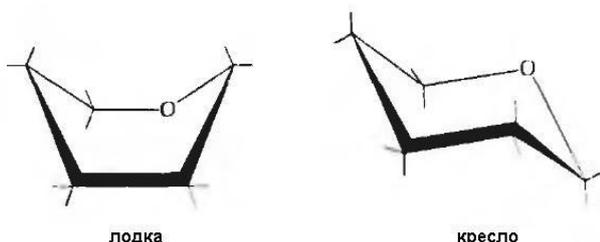
принадлежностью к стереоизомерам, называются эпимерами.

Биологически наиболее важными эпимерами глюкозы являются: манноза и галактоза, образующиеся путем эпимеризации при атомах углерода 2 и 4 соответственно.

5. **Альдо-кето-изомеризация.** Фруктоза имеет ту же химическую формулу, что и глюкоза, но отличается по структурной формуле, поскольку фруктоза содержит потенциальную кетонную группу в положении 2, а глюкоза — потенциальную альдегидную группу в положении 1.

Конформация моносахаридов

Шестичленные кольца из одинарных связей, в циклогексане и в сахарах, как правило, принимают конформацию «кресла», как это видно на примере



глюкозы. Помимо этого, шестичленные кольца могут принимать менее устойчивую конформацию «лодки». Свободно переходят одна в другую через промежуточные скошенные конформации.

Пятичленные кольца образуют конформацию «конверта»

Физические свойства моносахаридов

Моносахариды гидрофильны, а, следовательно, легко растворимы в воде. Растворимость моносахаридов примерно одинакова, поэтому разделение моносахаридов достаточно сложно. Моносахариды не поглощают свет ни в видимой, ни в ультрафиолетовой части спектра. Из-за этого нельзя определять

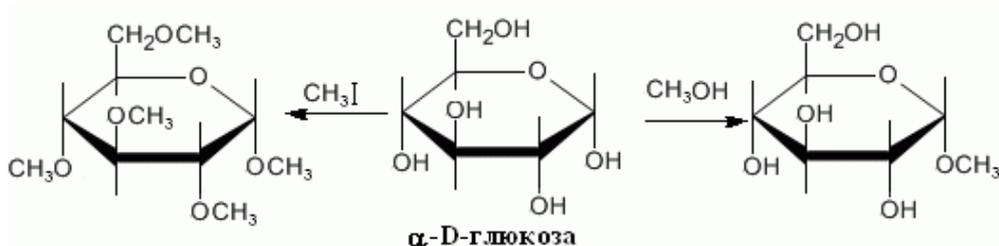
концентрацию моносахаридов спектрофотометрическими методами. Так как моносахариды находятся в природе либо в растворе, либо в кристаллах, в физиологических диапазонах температуры нет вопроса о температурах плавления и кипения.

Химические свойства моносахаридов

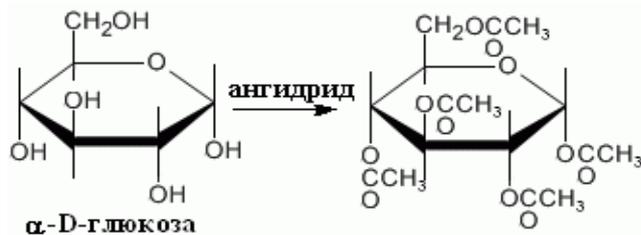
По своей структуре моносахариды содержат два типа функциональных групп спиртовые и альдегидные (кетонные), соответственно моносахариды вступают в реакции по этим группам. Моносахариды вступают во многие химические реакции, весьма важные для практического использования и исследования углеводов. Реакции, обсуждаемые в данном разделе, демонстрируют либо наиболее важные свойства углеводов, либо типы реакций, часто встречающиеся в их метаболизме.

1. Образование эфиров. Это реакция спиртовых групп образуются либо эфиры неорганических кислот, либо органические эфиры (простые со спиртами или галогенидами или сложные с ангидридами кислот). Наиболее активной является полуацетальная спиртовая группа, соответственно она чаще вступает в реакции с образованием эфиров. Эфиры фосфорной и уксусной кислот занимают уникальное место в биохимии и встречаются во многих углеводах и их производных.

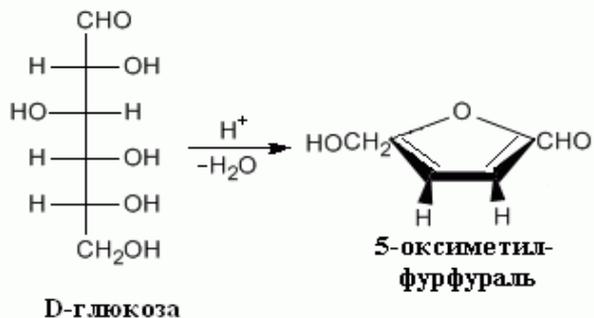
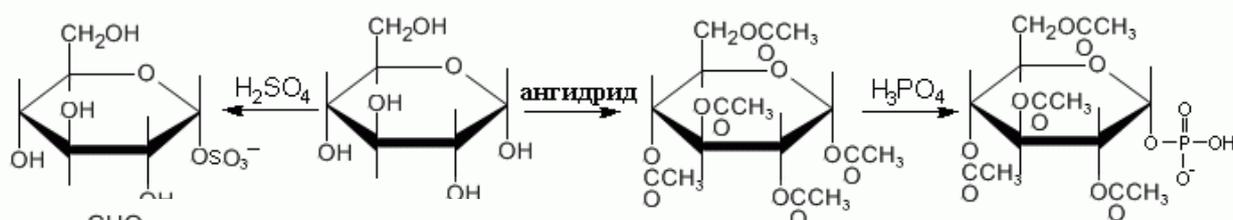
- алкилирование



- ацилирование



- образование эфиров неорганических кислот



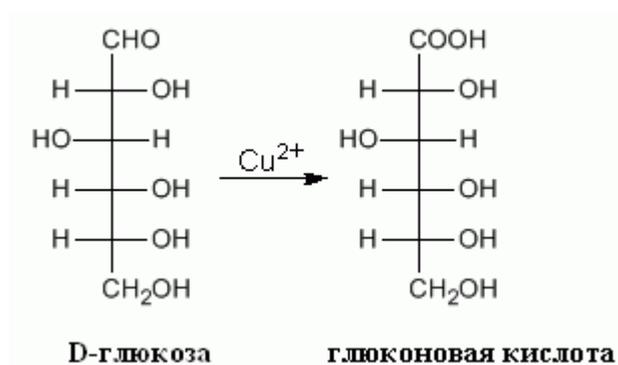
2. Дегидратация. В сильных минеральных кислотах высокой концентрации происходит

дегидратация пентоз и гексоз. Фурфурол и оксиметилфурфурол легко полимеризуются; при этом получается коричневая смола. Они также конденсируются с различными фенолами, образуя характерно окрашенные продукты; многие цветные реакции на углеводы основаны на этом свойстве.

3. Перегруппировка в щелочной среде. В холодном разбавленном щелочном растворе глюкоза образует маннозу и фруктозу. Механизм реакции, возможно, включает енолизацию, которая сопровождается диссоциацией водорода от атома углерода, примыкающего к карбонильной группе. Так образуются эпимеры — глюкоза и манноза.

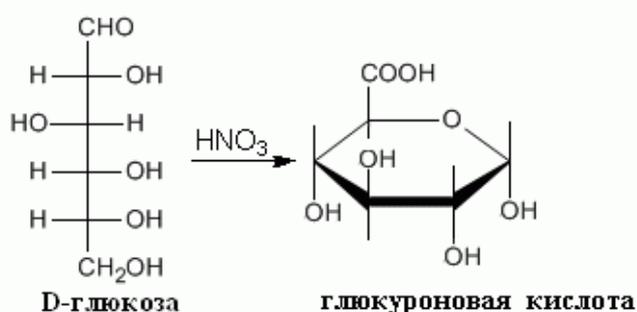
4. Окисление моносахаридов. Окисление моносахаридов, возможно, многими способами.

- мягкое окисление альдоновых кислот. В горячих щелочных растворах моносахариды реагируют с некоторыми окисляющими агентами, такими, как Cu^{2+} , Ag^+ и $\text{Fe}(\text{CN})^-$, давая смесь



продуктов окисления углевода и изменяя окраску окисляющего агента. Эти окислительно-восстановительные реакции используются как тесты на восстанавливающие сахара, т. е. на углеводы с незамещенным аномерным альдегидным атомом углерода.

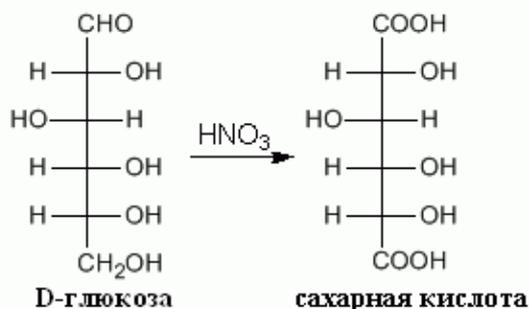
Глюконовая кислота образуется в виде соли при взаимодействии D-глюкозы с гипоиодитами в щелочной среде. Эта реакция специфична для альдоз и используется для того, чтобы отличить их от кетоз.



- более жесткое окисление до альдуриновых кислот, реакция происходит при участии «средних» окислителей, например небольшие концентрации азотной кислоты. Данная реакция происходит и в природе, но при других условиях. В результате окисляется гидроксильная группа при

последнем атоме углерода.

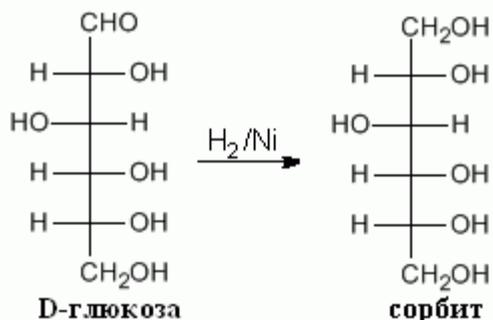
- жесткое окисление до альдаровых кислот, реакция происходит в жестких условиях, например при больших концентрациях сильных кислот



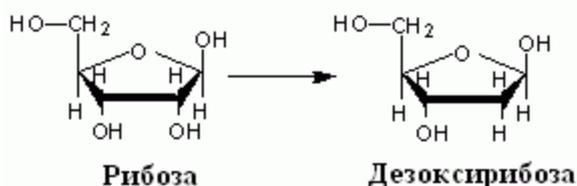
например азотной. В результате происходит окисление обеих групп альдегидной и последней спиртовой, в результате образуется дикарбоновая кислота, или альдаровая.

5. Восстановление моносахаридов. Восстановлению могут подвергаться как альдегидная, так и спиртовые группы

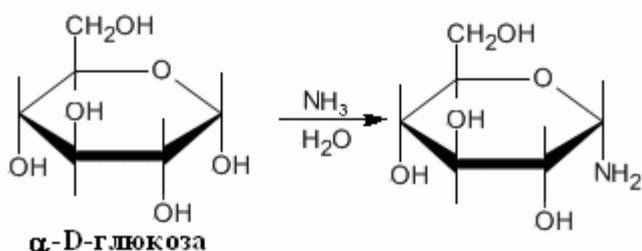
- восстановление альдегидной группы. D-Глюкоза и L-сорбоза восстанавливаются газообразным водородом в присутствии подходящего металлического катализатора, образуя сорбит.



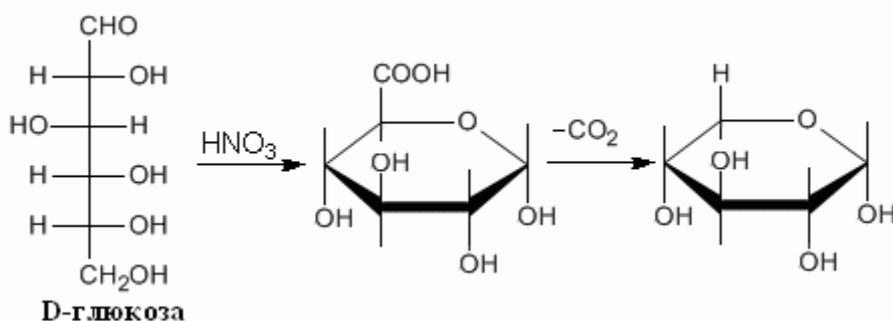
- восстановление спиртовой группы. В клетке происходит переход рибозы в дезоксирибозу. Эта реакция происходит в природе, но при несколько иных условиях. Это один из основных способов синтеза дезоксисахаров.



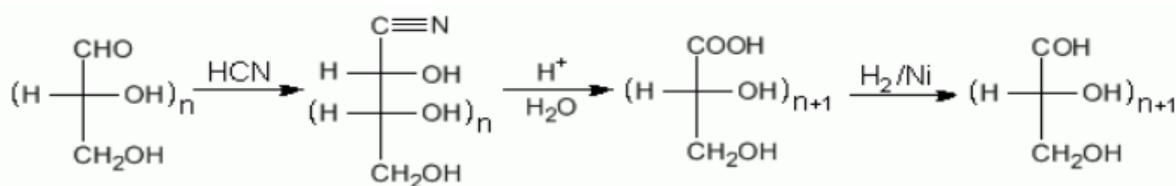
6. Образование аминсахаров. В природе также происходит синтез аминсахаров, но механизм и атакуемые группы отличаются, в искусственной системе в реакцию вступает полуацетальная группировка как наиболее реакционно способная.



7. Укорочение цепи. Этот процесс связан с окислением в средних условиях. Карбоксильная группа в последнем положении нестабильна и легко отщепляется от молекулы, в результате углеводов становится на один атом короче



8. Удлинение цепи. Это результат реакции с цианидом, затем происходит реакция с водой, в результате образуется кислота. Восстановление



карбоксильной группы

приводит к образованию моносахарида, но на один атом углерода быстрее.

9. Гидролиз поли- и олигосахаридов

Качественные реакции моносахаридов

Таблица 1. Качественные реакции для идентификации моносахаридов

Реагент	Тип углевода	Примечание
α -нафтол (реакция Молиша), триптофан, амингуанин	Альдозы, кетозы	Более чувствительна для кетоз
Резорцин (реакция Селиванова)	Кетогексозы	
Цистеин/карбазол	Кетогексозы, Кетопентозы, метилпентозы, диоксиацетон	
карбазол	Все углеводы, включая уроновые кислоты и дезоксипентозы	Характерное окрашивание со всеми углеводами.
Цистеин/ H_2SO_4	Многие углеводы, включая полисахариды, чаще используется для гексоз.	Неодинаковое окрашивание с различными углеводами.
Антраон	Многие углеводы, включая полисахариды, чаще используется для гексоз.	Неодинаковое окрашивание с различными углеводами.
Орцин	Пентозы, гептулозы, уроновые кислоты	Окрашивание, обусловленное присутствием других углеводов, может быть ликвидировано независимыми методами, уроновые кислоты декарбоксилируются до пентоз и вступают в реакцию

Нафтил резорцин	Уроновые кислоты	
<p>Рисунок 6: Структурные формулы основных дисахаридов</p>		
Ацетилацетон-n-диметил-аминобензальдегид	гексозамины	
Нитрит/индол	гексозамины	Аминосахара не дают окашивания без предварительного дезаминирования нитритом
дифениламин	Моно и дидезоксипентозы	
Триптофан/НСЮ ₄	дезоксипентозы	

индол/НСI	дезоксипентозы	
Лейкофуксин (Реакция Фольгена)	дезоксипентозы	
Тиобарбитуровая кислота	Сиаловые кислоты	

Функции моносахаридов

Функции моносахаридов очень разнообразны и зависят от того сколько атомов углерода содержит моносахарид.

- Триозы - промежуточные продукты обмена углеводов и липидов.
- Тетрозы - промежуточные продукты обмена углеводов могут входить в состав полисахаридов.
- Пентозы - промежуточные продукты обмена углеводов могут входить в состав полисахаридов, и нуклеотидов.
- Гексозы – глюкоза и фруктоза основные сахара энергетического обмена углеводов, входят в состав полисахаридов.
- Гептозы - промежуточные продукты обмена углеводов.

Таблица 2. Физиологически важные моносахариды

Сахар	В какие молекулы или вещества входит	Биологическое значение
D-рибоза	Нуклеотиды, коферменты, РНК	Компонент нуклеиновых кислот коферментов (NAD, NADP, FAD), нуклеотидов, промежуточное соединение пентозофосфатного пути
D-рибулоза	Образуется в ходе метаболизма	промежуточное соединение пентозофосфатного пути
D-Арабиноза	Гуммиарабик, сливовая и вишневая мякоть	Компонент гликопротеинов
D-Ксилоза	Древесная смола, протеогликаны, гликозаминогликаны	Компонент гликопротеинов
D-Ликсоза	ликсофлавин	Компонент ликсофлавина, выделяемого сердечной мышцей.
L-Ксилулоза	Промежуточный продукт метаболизма уроновых кислот	Промежуточный продукт метаболизма уроновых кислот
D-глюкоза	Фруктовые соки, крахмал, сахароза, лактоза, мальтоза	Сахар организма, участвует в энергетическом обмене, является предшественником других соединений
D-фруктоза	Мед, сахароза, лактоза, инулин	Превращается в глюкозу, и может использоваться в тех же метаболических путях
D-галактоза	Лактоза, гликопротеины, гликолипиды	Превращается в глюкозу, и может использоваться в тех же

		метаболических путях
D-манноза	Растительные маннаны, камеди, гликопротеины	

Производные моносахаридов

Производные моносахаридов: эфиры моносахаридов, альдурановые кислоты, аминосахара, дезоксисахара, гликозиды.

Все производные моносахаридов входят в состав полисахаридов.

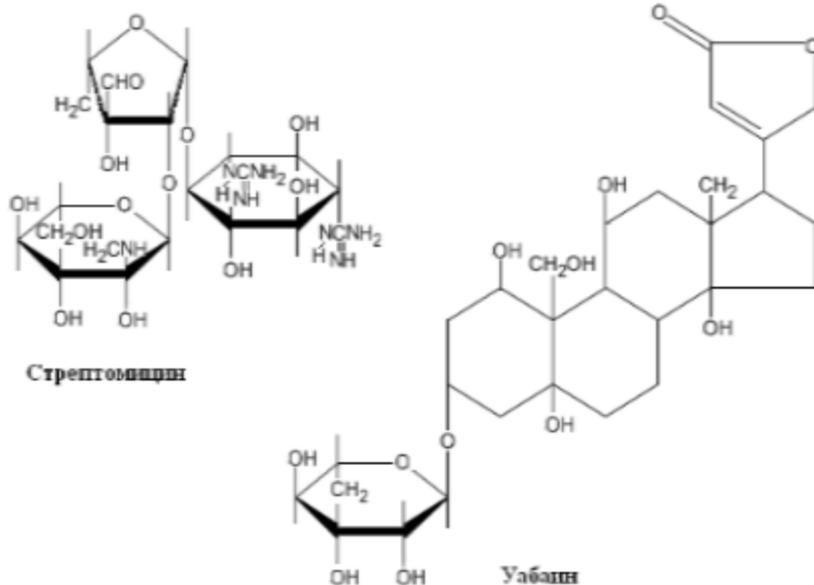


Рисунок 7: Структура некоторых гликозидов

Рисунок 8: Структура гликогена

Кислоты участвуют в образовании витамина С и в процессах детоксикации. Дезоксисахара входят в состав нуклеотидов (мономеров ДНК).

Аминосахара входят в состав антибиотиков.

Гликозиды

Гликозиды — это соединения, образующиеся путем конденсации моносахарида (или моносахаридного остатка в составе более сложного сахара) с гидроксильной группой другого соединения, которым может быть другой моносахарид или вещество неуглеводной природы (тогда его называют агликоном). Гликозидную связь называют ацетальной, так как она образуется в результате реакции между полуацетальной группой (образующейся при взаимодействии альдегида с —ОН-группой) и другой

— ОН-группой. Если полуацетальная группа принадлежит глюкозе, образующееся соединение называют глюкозидом, если галактозе — галактозидом и т.д. Гликозиды найдены в составе многих лекарств и пряностей, они являются также компонентами животных тканей. Агликонами могут быть метанол, глицерол, какой-либо стерол или фенол. Гликозиды, имеющие важное медицинское значение, а именно влияющие на работу сердца

(сердечные гликозиды), содержат в качестве агликонового компонента стероиды; так, из наперстянки и строфанта выделен гликозид убаин — ингибитор Na/K-АТФазы клеточных мембран. К числу гликозидов относится ряд антибиотиков, в частности стрептомицин.

Дисахариды

Дисахариды состоят из двух ковалентно связанных друг с другом моносахаридов. У большинства дисахаридов химическая связь между

Рисунок 9: Структура запасющих полисахаридов бактерий

моносахаридными единицами называется гликозидной связью; она образуется в результате взаимодействия гидроксильной группы одного из Сахаров с аномерным атомом углерода второго сахара. Гликозидные связи легко гидролизуются кислотами, но устойчивы к действию оснований. Поэтому дисахариды можно гидролизовать и получить в свободном виде их

моносахаридные компоненты путем кипячения в разбавленной кислоте.

По составу дисахариды подразделяют на гомодисахариды (состоят из одинаковых мономеров) и гетеродисахариды (в состав входят разные моносахариды).

По наличию свободной полуацетальной группы дисахариды можно разделить на две группы: восстанавливающие (редуцирующие) и невосстанавливающие (нередуцирующие). Свободная полуацетальная группа способна разделяться с образованием спиртовой и альдегидной или кетонной группы, то есть происходит разрыв цикла. Образовавшаяся альдегидная (кетонная) группировка может вступать реакцию с ионами металлов (Cu^{2+} , Ag^+) и восстанавливать их — редуцирующие дисахариды. Если все свободные полуацетальные группировки образуют гликозидные связи, то разрыв цикла невозможен, также как и восстановление альдегидной (кетонной) группы, следовательно не может вступать в реакцию восстановления с ионами металлов — нередуцирующие дисахариды.

Все дисахариды являются гликозидами. Называя дисахарид необходимо учитывать факт, что это гликозиды. Кроме того при номенклатуре дисахаридов необходимо учитывать так же химическую связь между моносахаридами. То есть указываются номера атомов углерода, спиртовые группы при которых участвуют в образовании гликозидной связи, а также аномер моносахарида чей полуацетальный гидроксил образует гликозидную связь.

Практически все дисахариды выполняют транспортную функцию, так как они легко растворимы, и при этом менее функционально активны чем моносахариды.

Часть дисахаридов например мальтоза являются промежуточными продуктами гидролиза полисахаридов.

Дисахариды можно подразделить на дисахариды растений и дисахариды животных.

Дисахариды животных

Мальтоза гомодисахарид, содержащий два остатка α D-глюкозы, соединенных α (1 -4) гликозидной связью, то есть связь между гидроксилом при 1 углеводе и гидроксилом при 4 углеводе, при чем полуацетальный гидроксил в α форме. Оба остатка глюкозы в молекуле мальтозы находятся в пиранозной форме. Мальтоза относится к восстанавливающим сахарам, поскольку она содержит одну потенциально свободную альдегидную группу, которая может быть окислена. Второй остаток глюкозы в молекуле мальтозы может существовать как в α -, так и в β -форме; Мальтоза образуется при действии на крахмал содержащегося в слюне фермента—амилазы. Под действием секретлируемого слизистой кишечника фермента мальтазы, специфически гидролизующего α (1 -4)-связь, мальтоза подвергается гидролизу с образованием двух молекул D-глюкозы.

Лактоза гетеродисахарид, при гидролизе которой образуется D-галактоза и D-глюкоза, моносахариды соединены α (1 -4) гликозидной связью, присутствует только в молоке. Наличие в молекуле лактозы потенциально свободной карбонильной группы (в остатке глюкозы) делает ее восстанавливающим дисахаридом. Лактоза является молочным сахаром, это единственный дисахарид, синтезируемый млекопитающими.

В процессе переваривания пищи лактоза подвергается ферментативному гидролизу в результате воздействия лактазы, секретлируемой мукозными клетками кишечника. У грудных младенцев активность этого фермента очень высока, однако в кишечнике взрослых людей лактазная активность наблюдается лишь у жителей севера Европы и некоторых африканских племен. У большинства взрослых людей, в том числе у жителей Востока, арабов, евреев, многих африканцев, индийцев и жителей Средиземноморья, лактазная активность в кишечнике очень низка, что часто приводит к непереносимости (интолерантности) лактозы. Описанная особенность обусловлена генетически. Причина непереносимости лактозы связана с тем, что этот дисахарид может всасываться в кишечнике только после гидролиза на моносахаридные компоненты: при низкой лактазной активности неусвоенная лактоза накапливается в кишечнике; в результате после потребления молока у человека с непереносимостью лактозы возникает тяжелый понос и боли в животе. Непереносимость лактозы не следует путать с генетическим заболеванием – галактоземией.

Трегалоза состоит из двух молекул α D-глюкозы, соединенных 1-1 α гликозидной связью. Трегалоза входит в состав гемолимфы насекомых, также выделяется из некоторых грибов. Является нередуцирующим дисахаридом.

Дисахариды растений

Сахароза — гетеродисахарид, состоящий из глюкозы и фруктозы, соединенных β (1-2) гликозидной связью. Сахароза является нередуцирующим сахаром. Сахарозу синтезируют многие растения, у высших же животных она отсутствует. В отличие от мальтозы и лактозы у сахарозы нет свободного аномерного атома углерода, поскольку оба аномерных атома моносахаридных остатков связаны друг с другом; поэтому сахароза не является восстанавливающим сахаром. Сахароза основной промежуточный продукт фотосинтеза. У многих растений именно в форме сахарозы транспортируются по сосудистой системе сахара из листьев к другим частям растения. Преимущество сахарозы перед глюкозой как транспортной формы сахаров заключается, вероятно, в том, что ее аномерные атомы углерода связаны друг с другом: это предохраняет сахарозу от атаки окислительных или гидролитических ферментов в процессе ее переноса из одной части растений в другую. Животные не могут усваивать сахарозу как таковую, однако она становится доступной для усвоения после воздействия фермента сахарозы (другое его название - инвертаза), локализованного в клетках, выстилающих тонкий кишечник. Этот фермент катализирует расщепление сахарозы на D-глюкозу и D-фруктозу, которые легко проникают в кровоток.

Полисахариды

В природе большинство углеводов представлено в виде полисахаридов с высокой молекулярной массой. Биологическое значение ряда полисахаридов состоит в том, что они обеспечивают накопление моносахаридов, другие же служат структурными элементами клеточных стенок и соединительной ткани. При полном гидролизе под действием кислоты или специфических ферментов полисахариды расщепляются с образованием моносахаридов или их производных. Полисахариды, называемые также гликанами, отличаются друг от друга как природой составляющих их моносахаридных остатков, так и длиной и степенью разветвленности цепей. Их можно разделить на два типа: гомополисахариды, состоящие из остатков одного и того же моносахарида, и гетерополисахариды, содержащие остатки двух или большего числа моносахаридов. Пример гомополисахарида резервный углевод крахмал, состоящий из остатков только D-глюкозы. Примером гетерополисахарида может служить содержащаяся в соединительной ткани гиалуроновая кислота, которая состоит из чередующихся остатков двух разных моносахаридов. В отличие от белков полисахариды нельзя характеризовать строго определенной молекулярной массой: как правило, они представлены смесями высокомолекулярных соединений; в зависимости от метаболических потребностей клеток моносахаридные остатки могут ферментативно присоединяться к полисахаридам или же отщепляться от них.

Также как, и дисахариды, полисахариды делятся на редуцирующие и нередуцирующие. По наличию свободной альдегидной группы, которая, окисляясь, восстанавливает ионы некоторых металлов. Многие полисахариды служат внеклеточными опорными элементами в стенках клеток одноклеточных микроорганизмов и высших растений, а также на внешней поверхности клеток животных. Другие полисахариды входят в состав соединительной ткани позвоночных и экзоскелета членистоногих. Структурные полисахариды защищают клетки, ткани и органы, придают им форму и поддерживают ее. Другая группа полисахаридов – запасующие полисахариды. Их функция – запасание энергии клетки, в виде углеводов. У различных организмов запасующие и структурные полисахариды различаются. К полисахаридам относятся следующие физиологически важные углеводы.

Запасующие полисахариды животных и грибов.

Гликоген — полисахарид, в виде которого углеводы запасаются в организме животного. Его часто называют животным крахмалом. В наибольшем количестве гликоген содержится в печени, где на его долю приходится до 7% общего веса органа; гликоген имеется также в скелетных мышцах. В клетках печени гликоген присутствует в виде крупных гранул, состоящих в свою очередь из меньших гранул; последние образованы единичными сильно разветвленными молекулами гликогена со средней молекулярной массой в несколько миллионов. С этими же гранулами прочно связаны ферменты, ответственные за синтез и распад гликогена. Гликоген откладывается в виде гранул в цитоплазме клетки. У млекопитающих гликоген откладывается в мышечной ткани и гепатоцитах печени. У грибов в клетках грибов.

Гликоген характеризуется более разветвленной структурой, чем амилопектин, линейные отрезки цепи включают 11—18 остатков α -D-глюкопиранозы [соединенных α (1-4)-гликозидными связями], в точках ветвления остатки соединены α (1-6)-гликозидными связями.

Запасующие полисахариды бактерий

Самый распространенный полисахарид бактерий – гликоген. Но также встречаются и другие типы.

Декстран. Гомополисахарид α D-глюкозы, мономеры соединяются 1-6 O-гликозидной связью, линейная или слабозветвленная молекула, молекулярная масса которой составляет примерно 10^6 . Продукты гидролиза этого полисахарида используются как плазмозаменители.

Леван. Запасующий полисахарид *Bacillus subtilis*. Полимер метилового эфира β D фруктозы, мономеры соединяются 1-6 гликозидной связью. Полимер отличается небольшой длиной 10-12 мономеров.

Запасующие полисахариды растений

Крахмал. Моносахаридные остатки соединены в крахмале α -глюкозидными связями. Соединение такой структуры, образованное только остатками глюкозы, является гомополимером, его называют глюкозаном или глюканом.

Это наиболее важный вид пищевых углеводов; он содержится в злаках, картофеле, бобовых и в других растениях. Двумя главными компонентами крахмала являются амилоза (15—20%), имеющая неразветвленную спиральную структуру, и амилопектин (80—85%), образованный разветвленными цепями, каждая ветвь состоит из 24—30 остатков глюкозы, соединенных (1 - 4)-связями [в точках ветвления остатки соединены (1 - 6)-связями]. Благодаря геометрическим особенностям α (1-4)-связей линейные участки полимерных цепей в молекулах гликогена и крахмала стремятся принять скрученную, спиральную конформацию, что способствует образованию плотных гранул, которые и обнаруживаются в большинстве животных и растительных клеток. α (1 -4)-связи гликогена и крахмала легко гидролизуются α -амилазой желудочно-кишечного тракта позвоночных, а образующаяся при этом D-глюкоза попадает в кровь и далее используется в энергетическом обмене.

Декстринами называют вещества, образующиеся при гидролизе крахмала. Название «остаточные декстрины» получили продукты, образующиеся на определенной стадии гидролиза.

Фруктаны. Гомополимеры β фруктозы, соединенной β (2-6) гликозидной связью, линейный полисахарид. Фруктаны встречаются у различных видов растений: ирисисин в корневищах ириса, аспарогозин в корнях спаржи, секалин – в ржи.

Рисунок 10: Структурные формулы запасяющих полисахаридов растений

Рисунок 11: Формулы структурных полисахаридов грибов

Инулин — полисахарид, содержащийся в клубнях и корнях георгинов, артишоков и одуванчиков. При его гидролизе образуется фруктоза, следовательно он представляет собой фруктозан. Гетерополимер одной молекулы глюкозы соединенной с β фруктозой β (1-1) гликозидной связью, мономеры β фруктозы, соединяются β (1-2) гликозидной связью. Этот полисахарид в отличие от картофельного крахмала легко

растворяется в теплой воде; его используют в физиологических исследованиях для определения скорости клубочковой фильтрации в почках.

Структурные полисахариды растений

Целлюлоза является линейным, неразветвленным гомополисахаридом, состоящим из 10000 и более остатков D-глюкозы, связанных друг с другом (1-4)-гликозидными связями; в этом отношении она сходна с амилозой и линейными участками цепей гликогена. Но между этими полисахаридами существует одно очень важное различие: в целлюлозе (1-4)-связи имеют β -конфигурацию, а в амилозе, амилопектине и гликогене - α -конфигурацию. Это, казалось бы, незначительное различие в строении целлюлозы и амилозы приводит к весьма существенным различиям в их свойствах. Что касается целлюлозы, то из-за конфигурации связей ее полимерные цепи сильно вытянуты и соединяются друг с другом бок о бок, образуя длинные нерастворимые фибриллы. Целлюлоза - прочное, волокнистое, водонерастворимое вещество - содержится в стенках клеток растений, главным образом в ветвях, стеблях, а также в стволах и других деревянистых частях растений. Древесина состоит в основном из целлюлозы и других полимерных веществ, хлопок - почти целиком из целлюлозы. Если наиболее распространенные внутриклеточные биополимеры - это белки, то целлюлоза, бесспорно, это не только самый распространенный внеклеточный структурный

Рисунок 12: Формулы структурных полисахаридов бактерий

полисахарид в растительном мире, но и вообще самый распространенный в природе биополимер. Ежегодно огромные количества целлюлозы

синтезируются растениями, причем не только растущими в лесах деревьями, но и культурными растениями. Расчеты показывают, что на долю каждого живущего на Земле человека растения ежедневно нарабатывают приблизительно 50 кг целлюлозы. Целлюлоза находит широкое применение в промышленности. Связи β (1-4) в молекуле целлюлозы не гидролизуются α -амилазами. Поскольку в кишечнике позвоночных нет фермента, способного гидролизовать целлюлозу, она не переваривается, и ее D-глюкозные остатки не могут служить пищей для большинства высших организмов. Целлюлозу хорошо переваривают термиты, но лишь потому, что в их кишечнике живут паразитические микроорганизмы *Trichonympha*, секретирующие целлюлазу, гидролизующий целлюлозу фермент, с помощью которого и происходит переваривание древесины у термитов. Целлюлазу синтезируют также некоторые бактерии и грибы, вызывающие гниение древесины. Среди позвоночных только крупный рогатый скот и другие жвачные (овцы, козы, верблюды, жирафы и т.д.) могут использовать целлюлозу в качестве пищи. Однако делают они это весьма необычным способом. Большая часть кишечника, составляющая 15% общего веса коровы, приходится на долю четырех последовательно соединенных друг с другом желудков. Первые два из них составляют так называемый рубец. Содержащиеся в нем микроорганизмы секретируют целлюлазу и расщепляют целлюлозу до D-глюкозы, которую далее сбраживают до короткоцепочечных жирных кислот, двуокиси углерода и газообразного метана (CH_4). Образовавшиеся жирные кислоты всасываются в кровотоки коровы, проникают в ткани и используются как топливо. Метан и CO_2 , которые вырабатываются со скоростью 2 л/мин, постоянно выводятся посредством непроизвольного процесса, напоминающего едва уловимую на слух отрыжку. В остальных двух желудках жвачных микроорганизмы, сделавшие свое дело, перевариваются ферментами, секретирруемыми слизистой желудка; при этом образуются аминокислоты, сахара и другие продукты, которые всасываются и используются в организме коровы в качестве питательных веществ. Таким образом, между коровой и населяющими ее рубец микроорганизмами устанавливаются отношения симбиоза, при котором микроорганизмы получают возможность насладиться короткой, но счастливой жизнью в удобной и теплой среде; при этом целлюлоза из клевера и другой травы служит основным источником топлива и для «жильцов», и для организма-хозяина.

Гемицеллюлозы

Это многообразные полисахариды растений входящих в клеточную стенку, примерами являются ксилоза и пектины

Ксилоза. Линейный гомополимер ксилозы, в β -пиранозной форме, мономеры соединяются β (1-4) гликозидной связью.

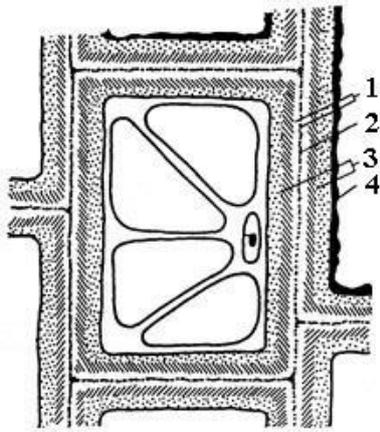
Пектины. Эти полимеры встречаются очень часто в клеточных стенках плодов и отвечают за их «желирующие» свойства (чем больше пектинов, тем плотнее джемы и повидло). Это гомополимер, мономером является метиловый эфир галактуроновой кислоты. Мономеры соединяются α (1-4) гликозидной связью. Последнее время этим молекулам уделяется большое внимание, некоторые

исследователи полагают, что пектины участвуют в выводе солей тяжелых металлов и радионуклидов.

Структура клеточных стенок растений

Клеточная стенка растений формируется при участии плазматической мембраны и является экстраклеточным (внеклеточным) многослойным образованием, защищающим поверхность клетки и служащим, как бы наружным скелетом растительной клетки. Клеточная стенка растений состоит из двух компонентов: аморфного пластичного гелеобразного матрикса (основы) с высоким содержанием воды и опорной фибриллярной системы. Дополнительные полимерные вещества и соли, часто входящие в состав оболочек, придают им жесткость и делают их несмачиваемыми. В химическом отношении главные компоненты оболочек растений относятся к структурным полисахаридам. В состав матрикса оболочек растений входят гетерогенные группы полисахаридов, растворяющиеся в концентрированных щелочах, гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Гемицеллюлозы представляют собой ветвящиеся полимерные цепи, состоящие из различных гексоз (глюкоза, манноза, галактоза и др.), пентоз (ксилоза, арабиноза) и урановых кислот (глюкуроновая и галактуроновая). Эти компоненты гемицеллюлоз сочетаются между собой в разных количественных отношениях и образуют разнообразные комбинации. Цепи гемицеллюлозных молекул не кристаллизуются и не образуют элементарных фибрилл. Из-за наличия полярных групп урановых кислот они сильно гидратированы. Пектиновые вещества — гетерогенная группа, в которую входят разветвленные, сильно гидратированные полимеры, несущие отрицательные заряды из-за множества остатков галактурононой кислоты. Благодаря свойствам своих компонентов матрикс представляет собой

ягкую пластическую массу, укрепленную фибриллами. Волокнистые



компоненты клеточных оболочек растений состоят обычно из целлюлозы — линейного, неветвящегося полимера глюкозы. Молекулярная масса целлюлозы варьирует от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^5$, что соответствует 300 — 3000 остаткам глюкозы. Такие линейные молекулы целлюлозы могут соединяться в пучки или волокна. В клеточной оболочке целлюлоза образует фибриллы, которые состоят из субмикроскопических микрофибрилл толщиной до 25 нм, а они в свою очередь состоят из множества параллельно лежащих цепей молекул целлюлозы. Количественные соотношения целлюлозы к веществам матрикса (гемицеллюлозы) могут быть

Рисунок 13: Рисунок 12: весьма различными у разных объектов. Свыше 60% сухой массы первичных оболочек составляет их матрикс и около 30% приходится на скелетное вещество — целлюлозу. В сырых клеточных оболочках почти вся вода связана с гемицеллюлозами, поэтому масса основного вещества в набухшем состоянии достигает 80% сырой массы всей оболочки, тогда как содержание волокнистых веществ сводится всего к 12%. В волосках хлопчатника целлюлозный компонент составляет 90% в древесине на долю целлюлозы приходится 50% от

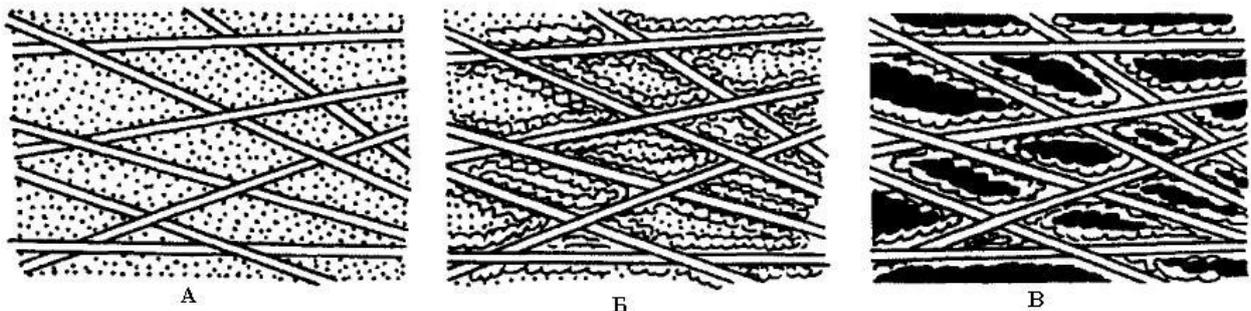


Рисунок 14: Инкрустация клеточной оболочки А— фибриллярный каркас и межфибриллярный матрикс; Б— инкрустированная лигнином и утерявшая способность к растяжению оболочка с остатками матрикса; В— последующее инкрустирование фенолами и (или) минеральными веществами, приводящее к повышению твердости оболочки

компонентов клеточной стенки. Кроме целлюлозы, гемицеллюлозы и пектинов в состав клеточных оболочек входят дополнительные компоненты, придающие им особые свойства. Так, инкрустация (включение внутрь) оболочек лигнином (полимер кониферилового спирта) приводит к одревеснению клеточных стенок, повышению их прочности. Лигнин замещает в таких оболочках пластические вещества матрикса, и играет роль основного вещества, обладающего высокой

прочностью. Часто матрикс укреплен минеральными веществами (SiO_2 , Ca_2CO_3 и др.). На поверхности клеточной оболочки могут скапливаться различные адкрузирующие вещества, например кутин и суберин, приводящие к опробковению клеток. В клетках эпидермиса на поверхности клеточных оболочек откладывается воск, который образует водонепроницаемый слой, препятствующий потере клеткой воды. Из-за своего пористого, рыхлого строения клеточная стенка растений проницаема в значительной степени для низкомолекулярных соединений, таких как вода, сахара и ионы. Но макромолекулы проникают через целлюлозные оболочки плохо: величина пор в оболочках, позволяющая свободную диффузию веществ, составляет всего лишь 3 — 5 нм. Опыты с мечеными соединениями показали, что при росте клеточной оболочки выделение веществ, из которых она строится, происходит по всей поверхности клетки. Аморфные вещества матрикса, гемицеллюлозы и пектины синтезируются в вакуолях аппарата Гольджи и выделяются через плазмалемму путем экзоцитоза. Фибриллы целлюлозы синтезируются специальными ферментами, встроенными в плазмалемму. Оболочки дифференцированных, зрелых, клеток обычно многослойные, в слоях фибриллы целлюлозы ориентированы по-разному, и количество их также может значительно колебаться. Обычно описывают первичные, вторичные и третичные клеточные оболочки. Для того чтобы разобраться в строении и появлении этих оболочек, необходимо познакомиться с тем, как они образуются после деления клеток.

Структурные полисахариды грибов

У различных групп грибов клеточная стенка формируется несколькими типами полисахаридов. У оомицетов (к ним относится возбудитель фитофторы) клеточная стенка образуется целлюлозой. У дрожжей – **маннаны**. Маннаны - редуцирующий гомополимер β -D-маннозы, моносахариды соединяются β (1-6) гликозидной связью. Полимер разветвленный. «Ветки» присоединяются β (1-2) связью. В результате образуется сложный пересекающийся каркас. У базидиомицетов клеточную стенку формирует **хитин**. Длинный неразветвленный редуцирующий гомополисахарид. Структуру хитина составляют N N-ацетил-O-глюкозаминовые звенья, соединенные β (1-4)-гликозидными связями.

Структурные полисахариды бактерий

Клеточная стенка бактерий располагается снаружи по отношению к клеточной мембране, образуя вокруг клетки жесткую пористую оболочку. Она физически защищает нежную клеточную мембрану и цитоплазму клетки. Структурной основой клеточных стенок большинства бактерий служит пронизанный поперечными ковалентными связями каркас, который почти целиком окружает клетку. Он состоит из длинных, параллельно расположенных полисахаридных цепей, связанных между собой через определенные интервалы поперечными сшивками из коротких полипептидных цепочек. Полисахаридные цепи состоят из чередующихся моносахаридных остатков N-ацетил-D-глюкозами и N-

ацетилмурамовой кислоты (сложного девятиатомного сахара), соединенных друг с другом $\beta(1-4)$ -связями. К каждому остатку N-ацетилмурамовой кислоты присоединена боковая тетрапептидная цепочка, образованная последовательно соединенными L-аланином, D-глутаминовой кислотой, мезо-диаминопимелиновой кислотой, D-аланином. Параллельные полисахаридные

цепи сшиваются короткими поперечными полипептидными цепочками, структура которых различна у разных видов бактерий. У гноеродных бактерий *Staphylococcus aureus*, вызывающих развитие фурункулов и нагноение ран, остатки ацетилмурамовой кислоты в соседних полисахаридных цепях связаны друг с другом пептидными цепочками, состоящими из пяти остатков глицина. Вся эта скрепленная поперечными связями структура, окружающая клетку, называется муреином или пептидогликаном; второе название подчеркивает гибридную природу данной структуры, представляющей собой сочетание пептидных и полисахаридных элементов. Тянущийся непрерывно вдоль всей поверхности бактериальной клетки пептидогликан можно рассматривать как одну гигантскую мешковидную молекулу. У грамположительных бактерий (дающих окраску по Грамму, т.е. при обработке красителем кристаллическим фиолетовым) пептидогликан образует вокруг клетки несколько концентрических слоев, пронизываемых другими макромолекулярными компонентами. У грамотрицательных бактерий, например у *E. coli*, пептидогликановый каркас покрыт богатой липидами внешней оболочкой, содержащей гидрофобные белки. Целостность клеточных стенок имеет жизненно важное значение для защиты, роста и деления бактерий. Действие пенициллина - одного из наиболее ценных антибиотиков, используемых для борьбы с бактериальными инфекциями, основано на том,

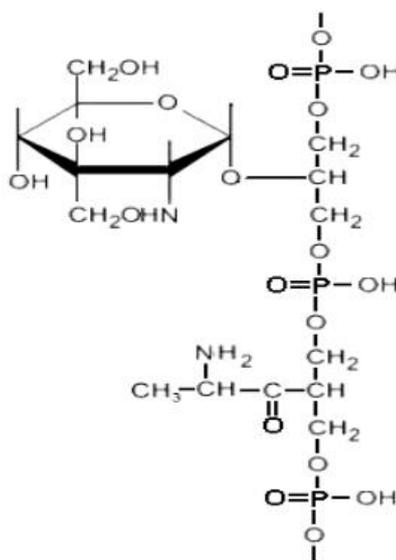
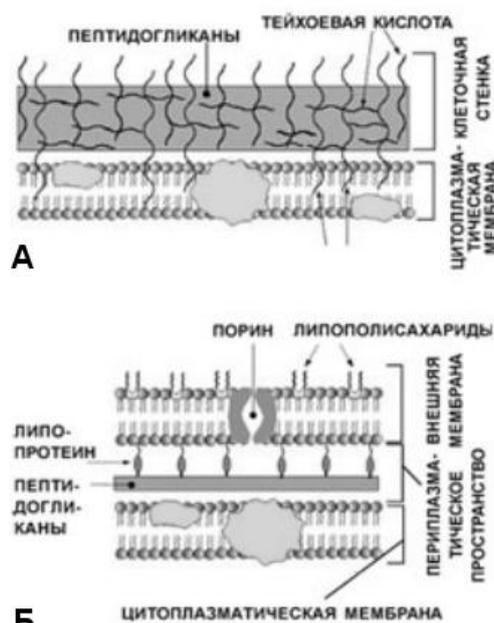
что
он
под
авл
яет
пос
лед
ний
эта
п
фер
мен
тат
ивн
ого
син
теза
пеп
тид
огл
ика
нов

Рисунок 15: Структура протеогликанов

у чувствительных к нему микроорганизмов; это приводит к формированию неполноценных клеточных стенок и подавлению роста бактерий

Структура клеточных стенок бактерий

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот резко отличается от таковой эукариотных организмов. В ее состав входят специфические полимерные комплексы, которые не содержатся в других клеточных структурах. Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида и являются важным диагностическим признаком. В зависимости от строения клеточной стенки прокариоты, относящиеся к эубактериям, делятся на две большие группы. Было обнаружено, что если фиксированные клетки эубактерий обработать сначала кристаллическим фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса различна: у так называемых грамположительных видов этот комплекс удерживается клеткой, и последние остаются окрашенными, у грамотрицательных видов, наоборот, окрашенный комплекс вымывается из клеток, и они обесцвечиваются. У некоторых эубактерий положительная реакция при окрашивании описанным выше способом свойственна только клеткам, находящимся в стадии активного роста. Выяснено, что окрашенный комплекс образуется на протопласте, но его удержание клеткой или вымывание из нее при последующей обработке спиртом определяются особенностями строения клеточной стенки. Клеточные



стенки грамположительных и грамотрицательных эубактерий резко различаются как по химическому составу, так и по ультраструктуре. В состав клеточной стенки эубактерий входят семь различных групп химических веществ, при этом пептидогликан присутствует только в клеточной стенке. У

Рисунок 16: Структуры клеточных стенок бактерий А — грамположительных; Б — грамотрицательных. В — Структурная формула глицеринтейхоевой кислоты. Содержит чередующиеся остатки D-аланина и N-ацетилглюкозамина.

грамположительных эубактерий он составляет основную массу вещества

клеточной стенки (от 40 до 90%), у грамотрицательных — содержание пептидогликана значительно меньше (1 — 10 %). Клеточная стенка цианобактерий, сходная с таковой грамотрицательных эубактерий, содержит от 20 до 50% этого гетерополимера. Под электронным микроскопом клеточная стенка грамположительных эубактерий выглядит как гомогенный электронно-плотный слой, толщина которого колеблется для разных видов от 20 до 80 нм. У грамотрицательных эубактерий обнаружена многослойная клеточная стенка. Внутренний электронно-плотный слой толщиной порядка 2 — 3 нм состоит из пептидогликана. Снаружи к нему прилегает, как правило, волнистый слой (8 — 10 нм), имеющий характерное строение: две электронно-плотные полосы, разделенные электронно-прозрачным промежутком. Такой вид характерен для элементарных мембран. Поэтому трехконтурный внешний компонент клеточной стенки грамотрицательных эубактерий получил название наружной мембраны. Клеточная стенка грамположительных эубактерий плотно прилегает к мембране в отличие от клеточной стенки грамотрицательных видов, компоненты которой (пептидогликановый слой и наружная мембрана) разделены электронно-прозрачным промежутком и четко отделены аналогичным образом от мембраны. Пространство между цитоплазматической и наружной мембранами получило название периплазматического. Оно, как можно видеть из строения клеточных стенок обеих групп эубактерий, характерно только для грамотрицательных форм. Клеточная стенка грамположительных эубактерий. Основную массу клеточной стенки грамположительных эубактерий составляет специфический гетерополимер — пептидогликан. У грамположительных эубактерий обнаружено более 100 различных химических типов пептидогликана. Большинство различий относится к пептидной части его молекулы. Две особенности пептидного хвоста заслуживают внимания: наличие аминокислот в D-форме (неприродная конфигурация) и высокое содержание аминокислот с двумя аминогруппами. Это имеет принципиальное значение для пространственной организации пептидогликана. Обе аминогруппы этих аминокислот могут участвовать в образовании пептидных связей, причем вторые аминогруппы — в формировании дополнительных пептидных связей между гетерополимерными цепочками. В большинстве случаев в образовании пептидной связи участвует карбоксильная группа D-аланина одного тетрапептида и свободная аминогруппа диаминопимелиновой кислоты другого. Иногда связь между тетрапептидами разных гликановых цепей осуществляется с помощью других аминокислот. Нетрудно себе представить, что этим способом можно «сшить» между собой множество гетерополимерных цепей. Частота «сшивок» различна, поскольку не все пептидные хвосты участвуют в формировании межцепочечных связей. Некоторые образуют ковалентные связи с другими химическими молекулами, входящими в состав клеточной стенки, и, наконец, часть тетрапептидных хвостов находится в свободном состоянии. Пептидогликан, окружающий протопласт грамположительных эубактерий, — это по существу одна гигантская молекула, «сшитая» с помощью гликозидных и пептидных связей. Именно последние обеспечивают ей трехмерную

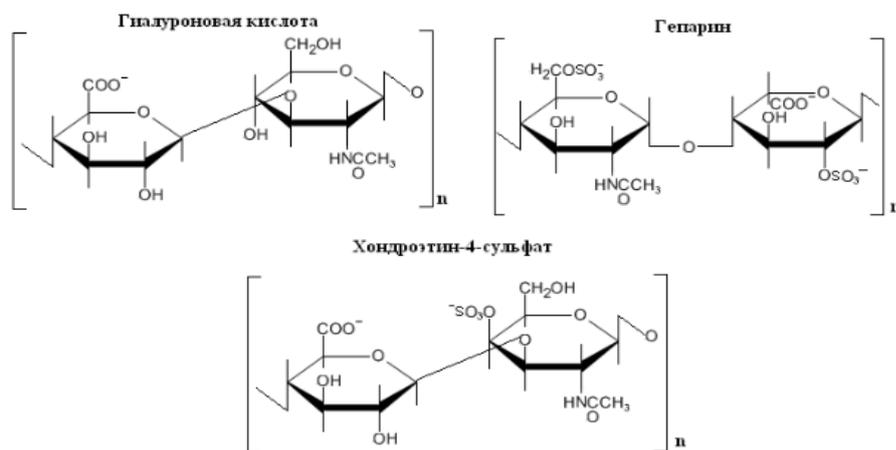
пространственную организацию. Кроме пептидогликана в состав клеточных стенок грамположительных эубактерий входит другой уникальный класс химических соединений — тейхоевые кислоты, представляющие собой полимеры, построенные на основе рибита (пятиатомного спирта) или глицерина (трехатомного спирта), остатки которых соединены между собой фосфодиэфирными связями. Некоторые свободные гидроксильные группы в молекулах спиртов могут быть замещены остатками D-аланина, глюкозы, N-ацетилглюкозамина и некоторых других сахаров. Тейхоевые кислоты ковалентно могут соединяться с N-ацетилмуравовой кислотой. Поскольку это длинные линейные молекулы, они могут пронизывать весь пептидогликановый слой, достигая внешней поверхности клеточной стенки. В этом случае, вероятно, они являются основными антигенами грамположительных эубактерий. Остающиеся свободные гидроксилы фосфорной кислоты придают тейхоевой кислоте свойства полианиона. Как полианионы тейхоевые кислоты определяют поверхностный заряд клетки. Сахарные компоненты тейхоевых кислот входят в состав рецепторов для некоторых бактериофагов и определяют возможность адсорбции фага на клеточной поверхности. В составе клеточной стенки грамположительных эубактерий в небольших количествах также найдены полисахариды, белки и липиды. Для полисахаридов и липидов показана возможность ковалентного связывания с макромолекулами клеточной стенки в отличие от белков, которые (у тех видов, где имеются) формируют на ее внешней поверхности отдельный слой. Таким образом, основными компонентами клеточной стенки грамположительных эубактерий являются три типа макромолекул: пептидогликаны, тейхоевые кислоты и полисахариды, которые с помощью ковалентных связей образуют сложную структуру с весьма упорядоченной пространственной организацией. Клеточная стенка бацилл, например *Bacillus subtilis*, приблизительно соответствует толщине 40 молекул пептидогликана. В целом клеточную стенку грамположительных эубактерий можно представить в виде губчатой структуры с порами диаметром примерно 1 — 6 нм. Возможность прохождения молекул через такую клеточную стенку определяется ее зарядом и размером пор. Клеточная стенка грамотрицательных эубактерий. У грамотрицательных эубактерий строение клеточной стенки намного сложнее, чем у грамположительных. В ее состав входит гораздо большее число макромолекул разного химического типа. Пептидогликан образует только внутренний слой клеточной стенки, неплотно прилегая к мембране. Для разных видов грамотрицательных эубактерий содержание этого гетерополимера колеблется в широких пределах. У большинства видов он образует одно- или двухслойную структуру, характеризующуюся весьма редкими поперечными связями между гетерополимерными цепями. Химическая структура пептидогликана грамотрицательных эубактерий в основном сходна со структурой типичного пептидогликана грамположительных эубактерий. Снаружи от пептидогликана располагается дополнительный слой клеточной стенки — наружная мембрана. Она состоит из фосфолипидов, типичных для элементарных мембран, белков, липопротеина и липополисахарида. Специфическим компонентом наружной мембраны является

липополисахарид сложного молекулярного строения, занимающий около 30 — 40% ее поверхности и локализованный во внешнем слое. Белки наружной мембраны можно разделить на основные и минорные. Основные белки представлены небольшим числом различных видов, но составляют почти 80% всех белков наружной мембраны. Одна из функций этих белков — формирование в мембране гидрофильных пор диаметром примерно 1 нм, через которые осуществляется неспецифическая диффузия молекул с массой до 600 — 900 Да. Это означает, что через такие поры могут проходить сахара, аминокислоты, небольшие олигосахариды и пептиды.

Структурные полисахариды животных

Хитин—важный структурный полисахарид беспозвоночных. Из него, в частности, построен наружный скелет ракообразных и насекомых. Структуру хитина составляют N N-ацетил-О-глюкозаминовые звенья, соединенные β (1-4)-гликозидными связями.

Гликозаминогликаны (мукополисахариды) У позвоночных входят в состав



межклеточного вещества в составе протеогликанов (соединения из углеводов и белков где углевод составляет 90%).

Гиалуроновая кислота образует очень вязкие, желеобразные растворы, входит в состав рыхлой и плотной соединительных тканей, а также в

Рисунок 17: Формулы структурных полисахаридов позвоночных

состав хряща. состоящий из многократно чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-О-глюкозамина, соединенных β (1-3) гликозидной связью. Это линейный редуцирующий гетерополисахарид Хондроитин, основной полисахарид протеогликанов хряща, это линейный, редуцирующий гетерополисахарид, содержащий чередующиеся остатки D-глюкуроновой кислоты и сульфатированного N-ацетил-D-галактозамина, единенные β (1-3) гликозидной связью. В зависимости от сульфатирования, есть 4 или 6 хондроитин сульфат. Также в состав межклеточного вещества соединительной ткани входят кератан сульфат и другие полисахариды.

Гепарин — это короткий линейный, редуцирующий гетерополисахарид, растворенный в плазме крови. В состав гепарина входят повторяющиеся единицы из остатков шести сахаров, каждая из которых представляет собой последовательность чередующихся остатков сульфопроизводных N-ацетил—

D-глюкозамина и D-идуроната. Гепарин препятствует свертыванию крови, то есть является антикоагулянтом. Его секретируют клетки выстилающие капилляры — эндотелиоциты. Выделенный из легочной ткани гепарин используется в медицине для предотвращения свертывания донорской крови, а также для предупреждения свертывания крови в сосудах при различных патологических состояниях, например, после приступов стенокардии.

Структурные полисахариды, входящие в состав межклеточного вещества, образуют протеогликаны — белково-углеводные комплексы, где белок составляет около 10%. Типичный протеогликан хрящевой ткани содержит около 150 полисахаридных цепей с молекулярной массой 20000 каждая; они (в виде боковых цепей) ковалентно присоединены к «сердцевинным» полипептидам (смотри рисунок 16). Такие протеогликаны представляют собой сильно гидратированные структуры.

20000 каждая; они (в виде боковых цепей) ковалентно присоединены к «сердцевинным» полипептидам. Такие протеогликаны представляют собой сильно гидратированные структуры.

Гликопротеиды – это молекулы белка, к которым присоединены короткие полисахаридные молекулы. В отличие от протеогликанов, в гликопротеидах белок составляет 95% молекулы. Кроме того, углеводный компонент короче – несколько десятков мономерных звеньев, очень разнообразен, можно сказать, что каждый белок имеет свой полисахарид. Полисахариды присоединяются к секретлируемым белкам клетки, а также к мембранным белкам, углеводная часть протеидов мембраны обращена во внешнюю среду клетки, формирует гликокалекс. В данном случае полисахарид выполняет сигнальную функцию, по таким разветвленным гетерополисахаридам клетки распознают друг друга. В частности группы крови А В определяются по полисахаридам располагающимся на поверхности эритроцитов. Здесь можно говорить не только о многообразии полисахаридного компонента каждого белка, но и о вариабельности этой молекулы для одного белка внутри популяции.

Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты

Структура нуклеотидов и азотистых оснований

Нуклеотиды принимают участие во множестве биохимических процессов, а также являются мономерами нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты обеспечивают все генетические процессы. Пожалуй, наиболее известна роль пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из трех типов химических молекул:

- азотистое основание
- моносахарид
- 1-3 остатка фосфорной кислоты

Азотистые основания

Азотистые основания относятся к гетероциклическим соединениям. В состав гетероцикла по мимо, атомов углерода входят атомы азота. Все азотистые основания, входящие в нуклеотиды относят к двум классам азотистых оснований пуриновые и пиримидиновые. Пуриновые основания это производные пурина гетероцикла, состоящего из двух циклов, один

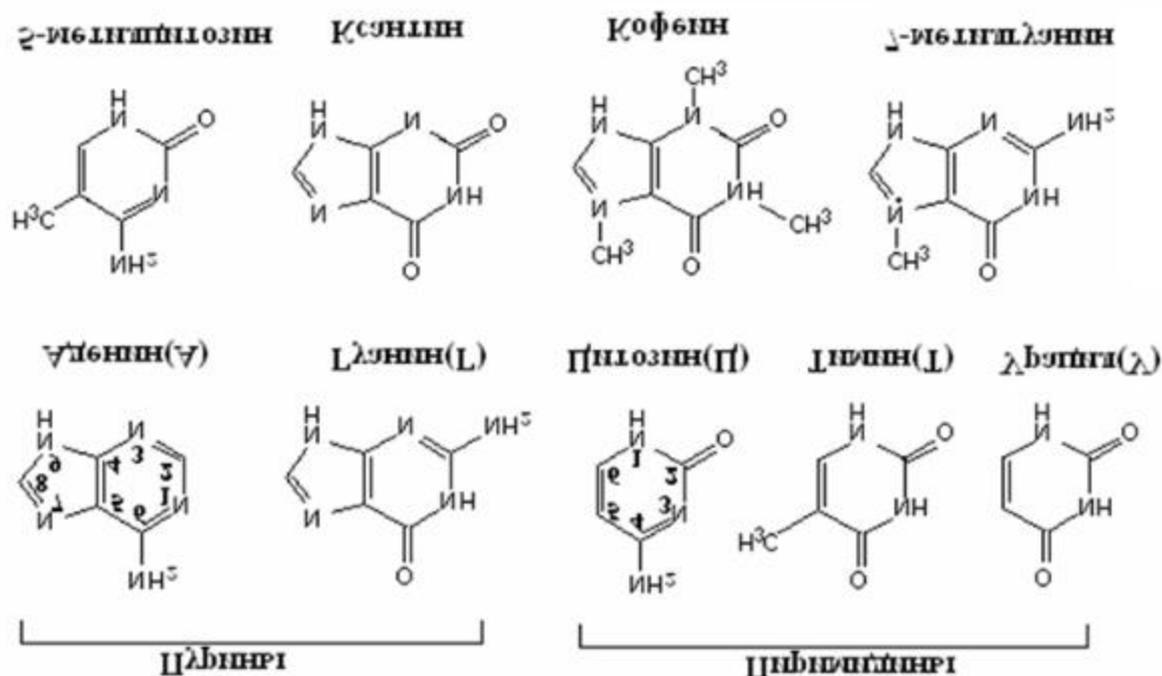


Рисунок 18: Структура азотистых оснований

член
ный
втор
ой
—
шест
и,
нуме
раци
я
осу
ществ
ляе
тся
так
как
пока
зано
на

рисунке. Пиримидиновые основания являются производными пиримидина и состоят из одного шестичленного цикла, нумерация также указана на рисунке. Главные пиримидиновые основания и у прокариот, и у эукариот—это **цитозин**, **тимин** и **урацил**. Из пуриновых оснований чаще всего встречаются **аденин** и **гуанин**. Два других—**ксантин** и **гипоксантин**—являются интермедиатами в процессах их метаболизма. У человека в роли конечного продукта катаболизма пуринов выступает окисленное пуриновое основание—**мочевая кислота**. Помимо пяти названных выше главных оснований известны и менее широко представленные минорные основания. Некоторые из них присутствуют только в нуклеиновых кислотах бактерий и вирусов, но многие также найдены в составе про- и эукариотических ДНК и транспортных РНК. Так, и бактериальная ДНК, и ДНК человека содержат значительные количества 5-метилцитозина; в бактериофагах обнаружен 5-гидроксиметилцитозин. Необычные основания выявлены в матричной РНК — N⁶-метиладенин, N⁶, N⁶-диметиладенин и N⁷-Метилгуанин. У бактерий также обнаружен модифицированный урацил с присоединенной по N₃-положению (α-амино, α-карбокси)-пропильной группой. Функции этих замещенных пуринов и пиримидинов до конца не выяснены.

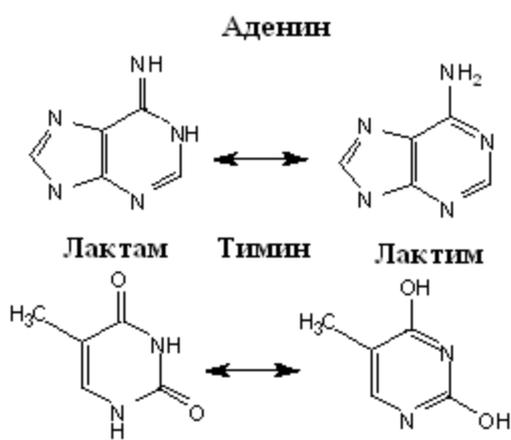
В клетках растений выявлена серия пуриновых оснований с металлическими заместителями. Многие из них фармакологически активны. В качестве примера

можно привести кофейные зерна, содержащие кофеин (1,3, 7-триметилксантин), чайный лист, содержащий теofilлин (1, 3-диметилксантин), и какао-бобы, в состав которых входит теобромин (3, 7-диметилксантин).

Физико-химические свойства пуриновых и пиримидиновых оснований

Таутомерия

Благодаря феномену кето-енольной таутомерии нуклеотиды могут существовать либо в лактимной, либо в лактамной формах, причем в физиологических условиях лактамная форма превалирует у гуанина и тимина. Важность этого обстоятельства станет ясна при обсуждении процессов спаривания оснований.



Растворимость

При нейтральном рН наименьшей растворимостью обладает гуанин. Следующим в этом ряду стоит ксантин. Мочевая кислота в форме уратов сравнительно неплохо растворяется при нейтральном рН, но очень плохо растворима в жидкостях с более низкими значениями рН, таких, как моча. Гуанин в моче человека в норме отсутствует, а ксантин и мочевая кислота являются ее обычными компонентами. Последние два пурина часто

входят в состав камней мочевого тракта.

Поглощение света

За счет системы сопряженных двойных связей все азотистые основания поглощают в ультрафиолетовой части спектра. Спектр поглощения — график распределения оптической плотности в зависимости от длины волны. Для каждого азотистого основания свой спектр поглощения, по нему можно различить растворы различных азотистых оснований, но максимум поглощения у всех совпадает при длине волны 260 нм. Это позволяет легко и быстро определять концентрацию как азотистых оснований, так нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Спектр поглощения также зависит от рН раствора.

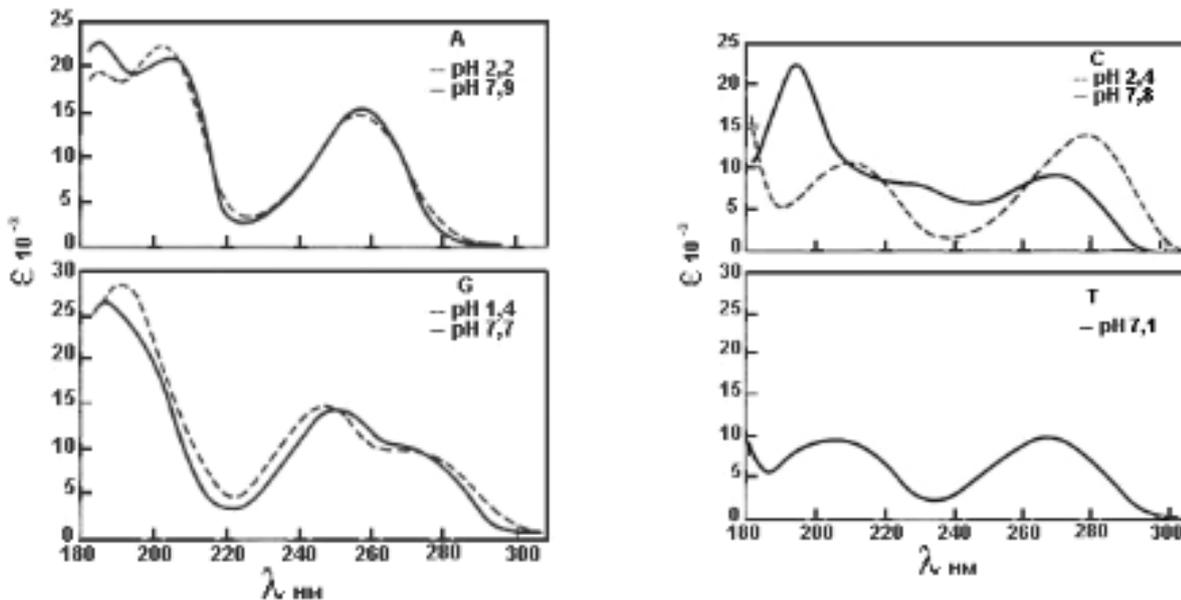


Рисунок 19: Спектры поглощения различных азотистых оснований

Функции азотистых оснований

Азотистые основания практически не встречаются в свободном состоянии. Исключение составляют некоторые алкалоиды и мочевая кислота.

Азотистые основания выполняют следующие функции:

- Входят в состав нуклеотидов
- Часть алкалоидов – азотистые основания.
- Промежуточные продукты обмена азотистых оснований и нуклеотидов.
- Мочевая кислота - причина мочекаменной болезни.
- В виде мочевой кислоты выводится азот у некоторых организмов.

Нуклеотиды и нуклеозиды

Молекулы нуклеозидов построены из пуринового или пиримидинового основания, к которому (β -связью присоединен углевод (обычно D-рибоза или 2-дезоксирибоза) в N_9 или N_1 -положении соответственно. Таким образом, адениновый рибонуклеозид (**аденозин**) состоит из аденина и D-рибозы, присоединенной в положении N_9 ; **гуанозин**—из гуанина и D-рибозы в положении N_9 ; **цитидин**—из цитозина и рибозы в положении N_1 ; **уридин**—из урацила и рибозы в положении N_1 .

В состав 2'-дезоксирибонуклеозидов входят пуриновые или пиримидиновые основания и 2'-дезоксирибоза, присоединенная по тем же атомам N_1 и N_9 . Присоединение рибозы или 2'-дезоксирибозы к кольцевой структуре основания происходит за счет относительно кислотолабильной N-гликозидной связи.

Нуклеотиды — это производные нуклеозидов, фосфорелированные по одной

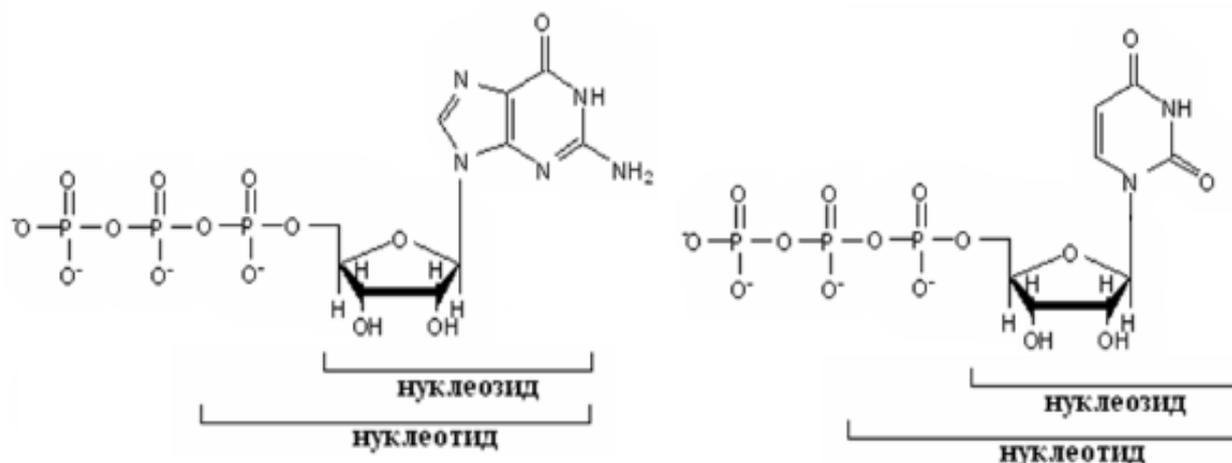


Рисунок 20: Структура пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов

или более гидроксильным группам остатка рибозы (или дезоксирибозы). Так, аденозинмонофосфат (АМФ или аденилат) построен из аденина, рибозы и фосфата. 2'-Дезоксиаденозинмонофосфат (dАМФ или дезоксиаденилат) представляет собой молекулу, состоящую из аденина, 2'-дезоксирибозы и фосфата. Обычно к урацилу присоединена рибоза, к тимину — 2'-дезоксирибоза. Поэтому тимидиловая кислота (ТМФ) состоит из тимина, 2'-дезоксирибозы и фосфата. Кроме вышперечисленных форм нуклеотидов обнаружены и нуклеотиды необычной структуры. Так, в молекуле тРНК выявлен нуклеотид, в котором рибоза присоединяется к урацилу в пятом положении, т.е. не азот-углеродной связью, а углерод-углеродной. Продукт этого необычного присоединения назван псевдоуридином (ψ). Молекулы тРНК содержат и другую необычную нуклеотидную структуру — тимин, соединенный с рибозомонофосфатом. Этот нуклеотид образуется уже после синтеза молекулы тРНК путем метилирования остатка UMP S-аденозилметионином. Псевдоуридиловая кислота (ψ МФ) тоже образуется в результате перегруппировки UMP после синтеза тРНК.

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

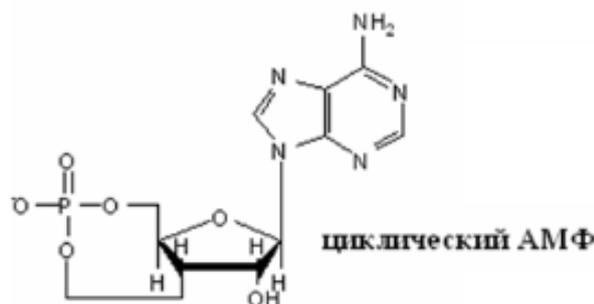


Рисунок 21: Структура цАМФ

Положение фосфатной группы в молекуле нуклеотида указывается цифрой. Например, аденозин с фосфатной группой, присоединенной к 3-му углероду рибозы, должен быть обозначен как 3'-монофосфат. Штрих после цифры ставят для того, чтобы отличить номер углерода в пуриновом или пиримидиновом основании от положения этого атома в остатке дезоксирибозы. При нумерации атомов

углерода основания штрих не ставится. Нуклеотид 2'-дезоксиаденозин с фосфатным остатком при углеводе-5 молекулы сахара обозначается как 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфат. Нуклеозиды, содержащие аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, принято обозначать буквами А, Г, С, Т и У соответственно. Наличие буквы d перед сокращением обозначает, что углеводным компонентом нуклеозида является 2'-дезоксирибоза. Гуанозин, содержащий 2'-дезоксирибозу, может быть обозначен dG (дезоксигуанозин), а соответствующий ему монофосфат с фосфатной группой, присоединенной к третьему атому углерода дезоксирибозы,—dG-3'-MP. Как правило, в тех случаях, когда фосфат присоединен к углероду-5 рибозы или дезоксирибозы, символ 5' опускается. Так, гуанозин 5'-монофосфат принято обозначать GMP, а 5'-монофосфат 2'-дезоксигуанозина сокращают как dGMP. Если к углеводному остатку нуклеозида присоединены 2 или 3 остатка фосфорной кислоты используются аббревиатуры DP (дифосфат) и TP (трифосфат). Таким образом, аденозин + трифосфат с тремя фосфатными группами в 5'-положении углевода будет обозначаться АТР. Поскольку в молекулах нуклеотидов фосфаты находятся в виде ангидридов фосфорной кислоты, т. е. в состоянии с низкой энтропией, их называют макроэргами (обладающими большим запасом потенциальной энергии). При гидролизе 1 моля АТР до АDP высвобождается 7,3 кКал потенциальной энергии.

Физико-химические свойства нуклеотидов

Так как в состав нуклеотидов входят азотистые основания, то такие свойства как таутомерия и способность поглощать в ультрафиолетовой части спектра также характерны и для нуклеотидов, причем спектры поглощения азотистых оснований и содержащих эти основания нуклеотидов сходны. Наличие сахара и остатков фосфорной кислоты делает их более гидрофильными чем азотистые основания. Все нуклеотиды являются кислотами так как содержат остатки фосфорной кислоты.

Функции природных нуклеотидов

1. Мономеры нуклеиновых кислот (РНК, ДНК). В состав ДНК входят дезоксирибонуклеотидфосфаты производные аденина, тимина, гуанина и цитозина. Также некоторые молекулы гуанина и цитозина в составе ДНК метилированы то есть содержат метильную группу. Как основные мономеры в состав РНК входят рибонуклеотидфосфаты производные аденина, урацила, гуанина и цитозина. Также в состав РНК входят нуклеотиды, содержащие различные минорные азотистые основания, например ксантин, гипоксантин, дигидроуридин и др.

2. Мономеры коферментов (НАД, НАДФ, ФАД, ко-энзим А, метионин-аденозин)

3. Энергетическая (АТФ). АТФ выполняет функцию основного внутриклеточного переносчика свободной энергии. Концентрация наиболее распространенного свободного нуклеотида в клетках млекопитающих—АТФ—составляет около 1 ммоль/л.

4. Сигнальная (цГМФ, цАМФ) Циклический АМФ (3', 5'-аденозинмонофосфат, цАМФ) — медиатор различных внеклеточных сигналов в клетках животных — образуется из АТФ в результате реакции, катализируемой аденилатциклазой. Активность аденилатциклазы регулируется комплексом взаимодействий, многие из которых инициируются через рецепторы гормонов. Внутриклеточная концентрация цАМФ (около 1 мкмоль/л) на 3 порядка ниже концентрации АТФ. Циклический цГМФ (3', 5'-гуанозинмонофосфат, цГМФ) служит внутриклеточным проводником внеклеточных сигналов. В некоторых случаях цГМФ выступает в роли антагониста цАМФ. цГМФ образуется из ГТФ под действием гуанилатциклазы — фермента, имеющего много общего с аденилатциклазой. Гуанилатциклаза, как и аденилатциклаза, регулируется различными эффекторами, в том числе и гормонами. Как и цАМФ, цГМФ гидролизуется фосфодиэстеразой до соответствующего 5'-монофосфата.

5. Регуляторная (ГТФ). Активность группы белков(G-белков), выполняющих в основном регуляторную функцию, зависит от того: какой нуклеотид они связывают. В неактивной форме эти белки связывают ГДФ, при активации белка происходит замена ГДФ на ГТФ. При выполнении своей функции белок гидролизует ГТФ до ГДФ и фосфата, выделившаяся, энергия затрачивается на функционирование белка.

6. Активация при метаболизме липидов и моносахаридов (УТФ, СТФ). Производные урациловых нуклеотидов участвуют в качестве активирующих агентов в реакциях метаболизма гексоз и полимеризации углеводов, в частности при биосинтезе крахмала и олигосахаридных фрагментов гликопротеинов и протеогликанов. Субстратами в этих реакциях являются уридин-дифосфатсахара. Например, уридиндифосфатглюкоза (UDPGlc) служит предшественником гликогена. Также превращение глюкозы в галактозу, глюкуроновую кислоту или другие производные моносахаридов происходит в виде конъюгата с УДФ. СТР необходим для биосинтеза некоторых фосфолипидов в тканях животных. Реакции с участием церамида и CDP-холина приводят к образованию сфингомиелина и других замещенных сфингозинов.

7. Участие в дезактивации различных спиртов и фенолов (УДФ-глюкуроновая кислота). Уридиндифосфатглюкуроновая кислота (UDPGlcUA)— выполняет функцию «активного» глюкуронида в реакциях конъюгирования, например, при образовании глюкуронида билирубина.

Нуклеотиды в составе коферментов

Коферменты это низкомолекулярные соединения связанные с ферментами (см раздел «Ферменты») непосредственно участвующие в в биохимической реакции, другими словами это еще один субстрат, не выходящий в окружающую среду.

Коферменты подразделяют на две группы:

- переносчики протоны и электроны, эти коферменты участвуют в окислительно-восстановительных реакциях;

- переносчики всех остальных групп кроме протонов и электронов, эти коферменты участвуют в трансферных реакциях.

Более подробно механизмы упомянутых реакций можно рассмотреть в главе «Ферменты».

Некоторые коферменты содержат в своем составе нуклеотиды. Они также делятся на эти же две группы.

Коферменты переносчики протонов и электронов

Эти коферменты участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, где аденозин выполняет только структурную функцию, в реакцию вступают нуклеотиды, содержащие другие

типы оснований, выделяют два типа таких коферментов: никотиновые и флавиновые. Они отличаются не только по активной группировке, но и по типу реакций, которые они осуществляют.

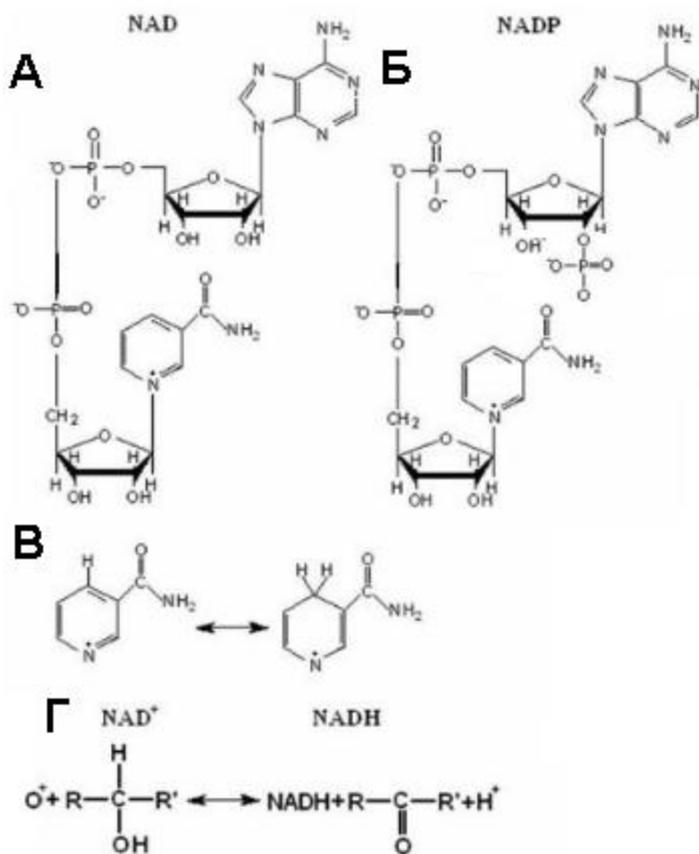


Рисунок 22: Никотиновые коферменты.
А - структура NAD, Б - структура NADP,
В - механизм активности никотиновой кислоты, Г - механизм работы никотиновых коферментов

теряемые субстратом, переносятся на никотинамидное кольцо. Роль донора электронов в большинстве процессов восстановительного биосинтеза; выполняет восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH). NADPH отличается от NAD наличием фосфата, связанного эфирной связью с 2'-гидроксильной группой аденозина. Окисленная форма NADPH обозначается как NADP⁺. NADPH переносит электроны таким же образом, как NADH. Однако, NADPH используется почти исключительно в процессах восстановительного биосинтеза, тогда как NADH используется

преимущественно для генерирования АТФ. Дополнительная фосфатная группа NADPH - это участок, ответственный за осуществление целевого предназначения молекулы, состоящего в распознавании ферментами.

Флавиновые коферменты

Первый флавиновый кофермент (флавиномононуклеотид FMN) был выделен А. Сент-Дьёрды из сердечной мышцы в 1932 г., Р. Г. Варбург и В. Христиан тогда

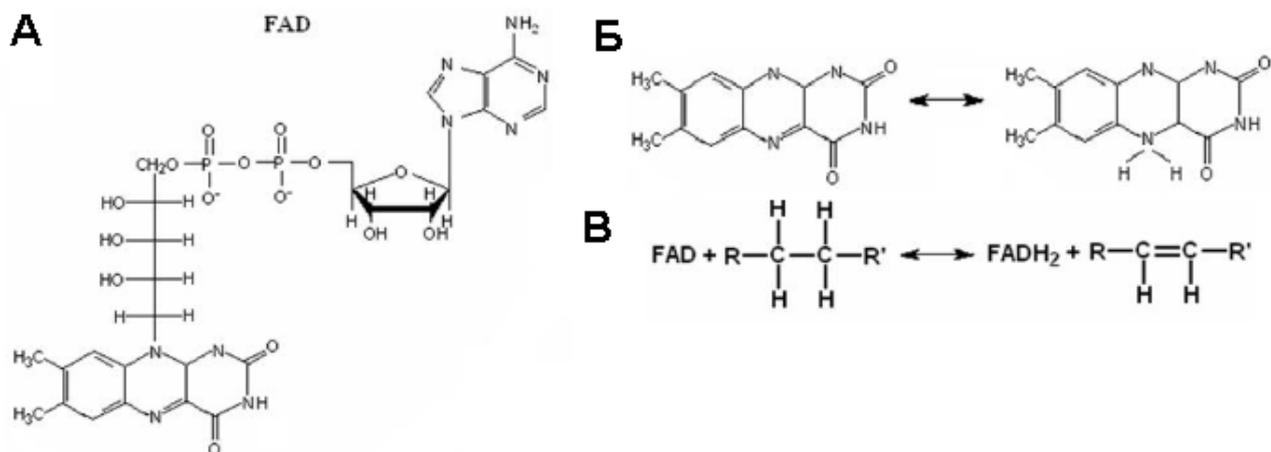


Рисунок 23: Флавиновые коферменты. А - структура FAD, Б - механизм активности никотиновой кислоты, Г - механизм работы флавиновых коферментов.

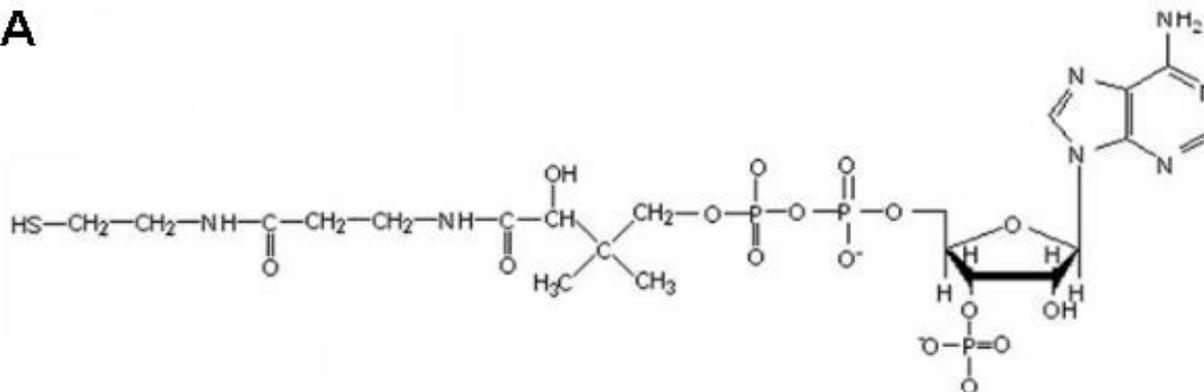
же получили из дрожжей первый флавопротеид, содержащий FMN в качестве кофермента. Второй важнейший флавиновый кофермент — флавинадениндинауклеотид (FAD) выделен ими же как кофактор оксидазы D-аминокислот в 1938 году. За счет окислительно-восстановительного превращения флавинового кольца флавиновые коферменты осуществляют окислительно-восстановительные реакции в составе многих важнейших ферментных систем: оксидаз (в частности, оксидаз D- и L-аминокислот, моноаминоксидазы, регулирующей уровень катехоламинов в крови) и дегидрогеназ (часто с участием никотинамидадениндинауклеотида и убихинонов).

Второй основной переносчик электронов при окислении топливных молекул - флавинадениндинауклеотид. Сокращения, используемые для обозначения окисленной и восстановленной форм этого переносчика - соответственно FAD и FADH₂. Реакционноспособная часть FAD-это его изоаллоксазиновое кольцо. FAD, подобно NAD⁺, присоединяет два электрона. Однако FAD в отличие от NAD⁺ присоединяет оба теряемых субстратом атома водорода.

Коферменты переносчики других группировок

Кофермент А - другая молекула, занимающая центральное место в метаболизме. В 1945 г, Липман установил, что для многих процессов апеллирования, катализируемых ферментами, требуется термостабильный

А



Б

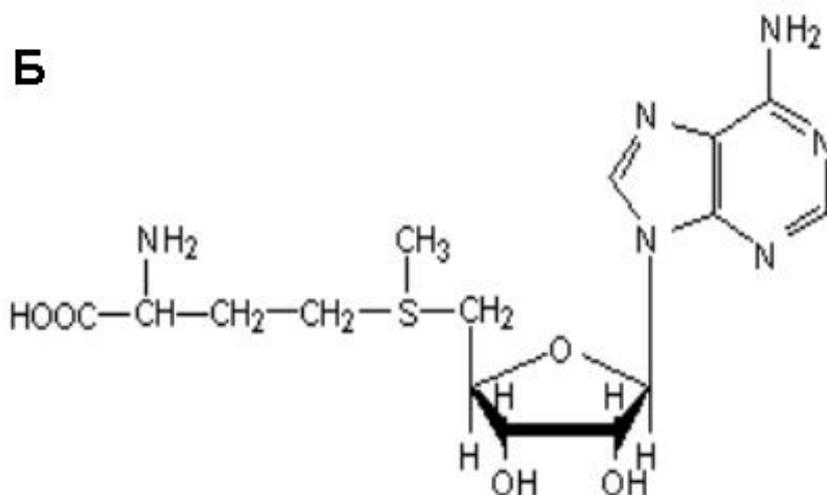


Рисунок 24: Структурные формулы коферментов, переносящих другие группы. А - коэнзим А; Б - S-аденозинметионин

кофактор. Этот кофактор был назван коферментом А (CoA), где А означает ацетилирование. Он был выделен, а несколькими годами позднее была определена его структура. Реакционноспособной частью молекулы CoA является концевая сульфгидрильная группа. Ацильные группы присоединяются к CoA при помощи тиозфирной связи. Образующееся в результате этого производное получило название ацил-CoA. Ацильная группа, связанная с CoA, часто бывает представлена ацетильной группой. Это производное называют ацетил-CoA. Другими словами, ацетил-CoA имеет высокий потенциал переноса ацетильных групп. Co A является переносчиком активированных ацетильных или других ацильных групп, подобно тому, как АТФ служит переносчиком активированных фосфорильных групп.

S-аденозил метионин — это кофермент, принимающий участие в реакциях переноса метильных групп. Впервые был описан в Италии ученым Кантони в 1952 году. S-аденозилметионин образуется из АТФ и метионина ферментом метионин аденозилтрансферазой. В клетке участвует в таких метаболических путях, как трансметилирование, транссульфирование и аминпролирование. И хотя эти анаболические реакции идут в многих тканях организма, большая часть S-аденозилметионина образуется в печени.

Метильная группа (CH₃), которая присоединена к атомы серы в молекуле метионина в составе S-аденозилметионина является химически активной. Поэтому метильная группа может быть перенесена на молекулу субстрата в трансметилазной реакции. Более сорока метаболических реакций требуют переноса метильной группы от S-аденозилметионина на такие субстраты, как нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Аденозилметионин участвует в синтезе фосфатидилхолина, холина, адреналина, витамина B₁₂ и др. Механизм трансметилирования - замещения под действием ферментов группы метилтрансфераз, специфичных к акцепторам метильной группы. Метилируются обычно атомы N и O, реже-S.

Перенос метильных групп на двойные связи ненасыщ. жирных кислот микроорганизмов приводит к образованию кислот с разветвленной цепью или содержащих циклопропановые кольца. В результате метилирования некоторых биологически активных соед. (напр., гистамина, никотинамида) образуются продукты, выводимые из организма. В белках метилированию могут подвергаться аминокислоты остатков лизина и аргинина. Метилирование пуриновых и пиримидиновых оснований, а также рибозных колец - самая распространенная модификация нуклеиновых к-т, особенно транспортных РНК. В полисахаридах аденозилметионин может, напр., метилировать атом O в положении 6 остатков D-глюкозы.

При элиминировании метильной группы аденозилметионин превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин, который гидролизуется до аденозина и гомоцистеина. Последний может быть в организме метилирован при участии N⁵-метилтетрагидрофолиевой к-ты с образованием метионина, который вновь может включаться в состав аденозилметионина. Известны и другие пути метаболизма S-аденозил-L-гомоцистеина: у млекопитающих - расщепление с образованием гомосерина, аденина и 5-метилтиорибозо-1-фосфата, у микроорганизмов-дезаминирование аденозинового или гомоцистеинового фрагментов молекулы, а также отщепление аденина.

Аденозилметионин служит также донором аминопропильных фрагментов при биосинтезе аминов-спермина, и спермидина, а также донором аминокислоты при синтезе биотина. Установлена регуляторная ф-ция аденозилметионина для нек-рых ферментов: воздействие аденозилметионина на одну из субъединиц фермента (напр., в результате переноса аденозильного остатка) меняет сродство к субстрату у другой.

Нуклеиновые кислоты

Первичная структура ДНК и РНК

Молекула НК высокомолекулярное соединение, мономером которого является нуклеотид. Рибоза и дезоксирибоза входят в состав НК в виде циклической

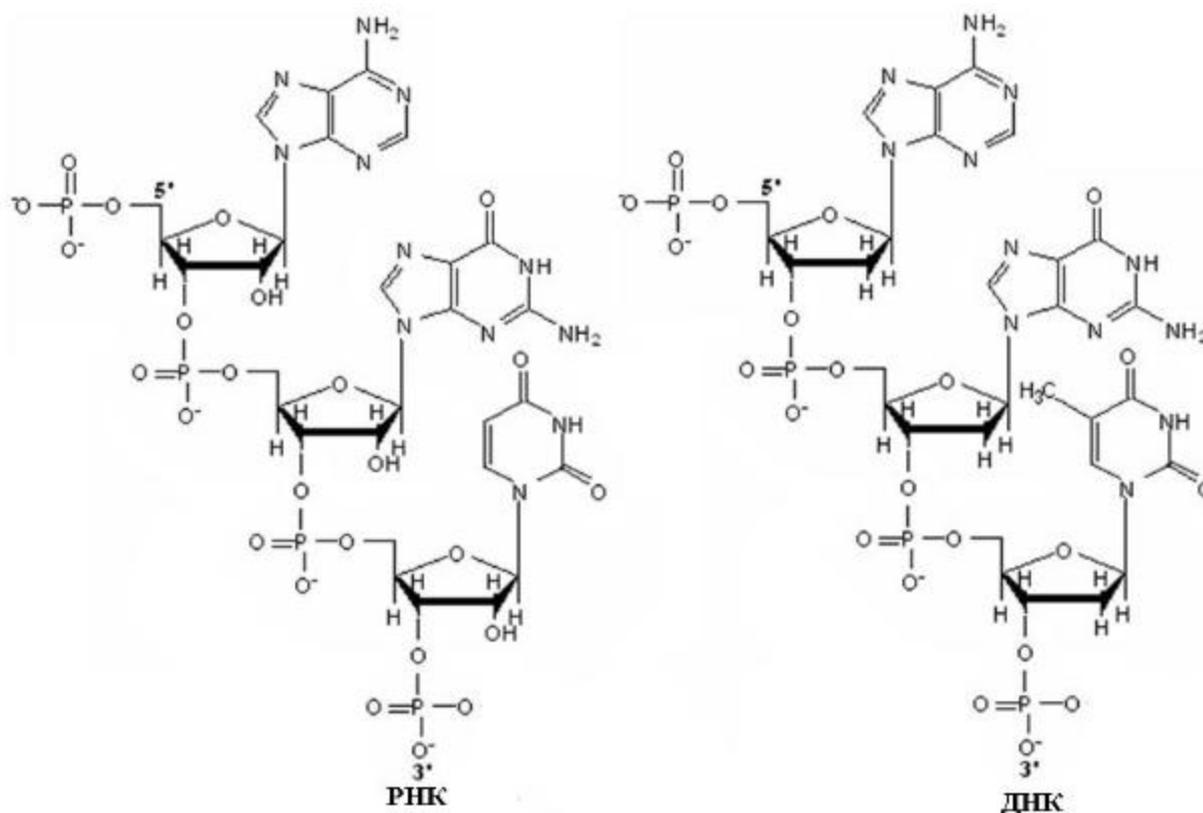


Рисунок 25: Первичная структура нуклеиновых кислот.

формы. Нуклеотиды присоединяются через остатки фосфорной кислоты, в результате образуя сахаро-фосфатный остов, где остаток сахара чередуется с остатком фосфорной кислоты. Остаток фосфорной кислоты присоединяется к 3'-гидроксильной группы предыдущего сахара и 5'-гидроксилом следующего. Молекула асимметрична, есть 5' и 3' концы, началом молекулы является 5'-конец, концом 3', так как синтез молекул нуклеиновых кислот происходит от 5' к 3' концу. ДНК и РНК различаются прежде всего по молекулам пентозы, входящим их состав. В РНК входит рибоза, в ДНК — дезоксирибоза. Различие между этими пентозами заключается в наличии ОН группы в 2' положении у рибозы. Эта группа обуславливает нестабильность и большую реакционную способность РНК (способность осуществлять катализ и реакции внутри молекулы). U — образуется в результате дезаминирования С, если бы это основание входило в состав ДНК точность репарации уменьшилась бы. Также существуют другие различия РНК и ДНК, которые представлены в таблице 3.

Таблица 3. Различия между РНК и ДНК.

	РНК	ДНК
пентоза	рибоза	2'-дезоксирибоза
азотистые основания	А, G, U, С	А, G, T, С
вторичная структура	одноцепочечная молекула сложной вторичной	двухцепочечная спираль

	структурой	
функция	транспортная каталитическая сохранение и передача генетической информации матрица для синтеза белка	сохранение и передача генетической информации

Вторичная структура ДНК

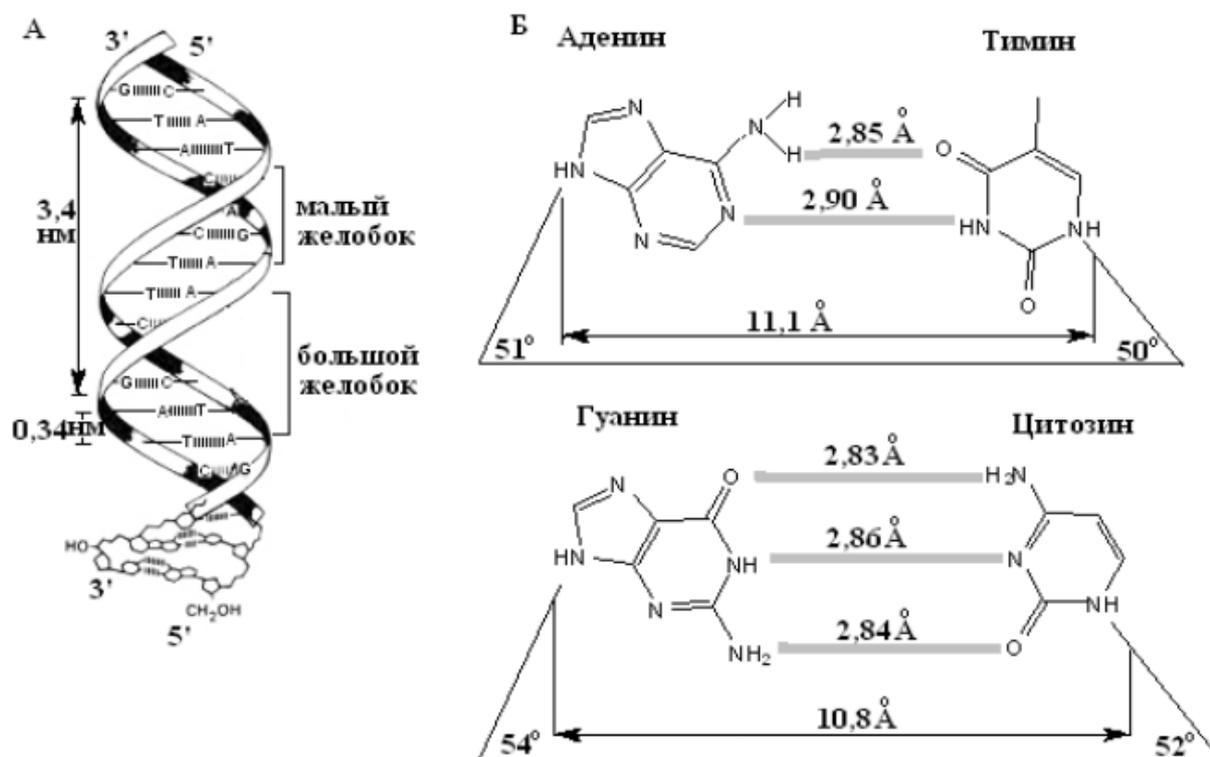


Рисунок 26: В-форма ДНК. А - общий план структуры В-формы ДНК; Б - структура водородных связей между основаниями в ДНК.

- Вторичная структура ДНК представляет собой двухспиральную молекулу. Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вокруг общей оси. Цепи направлены в противоположные стороны, то есть антипараллельны. То есть 3'-конец одной цепи взаимодействует с 5'-концом другой цепи. Цепи право закрученные.
- Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тиминном, гуанин - с цитозином. Это обеспечивается принципом комплиментарности — структурного и химического соответствия молекул друг другу. Аденозин в ДНК комплементарен тимину и между основаниями образуется две водородные связи. Гуанин комплементарен цитозину, образуя три водородные связи. Это возможно из-за жесткой структуры азотистых оснований.

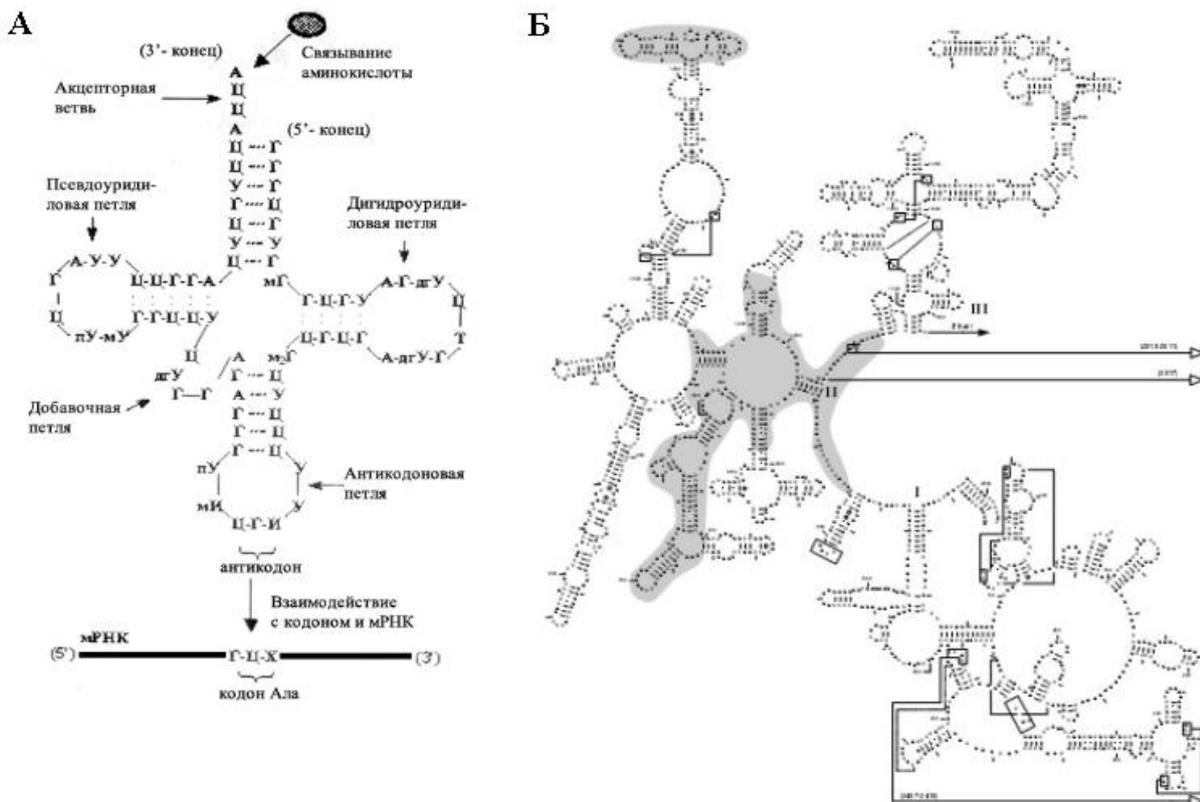
- Пуриновые и пиримидиновые основания расположены внутри спирали, а остатки фосфата и дезоксирибозы – снаружи. Плоскости оснований перпендикулярны оси спирали. Плоскости двух спаренных оснований образуют стопку. Между плоскостями образуются дополнительные связи между собой. Плоскости остатков сахара расположены почти под прямым углом к основаниям.
- Диаметр спирали 20 А. Расстояние между соседними основаниями вдоль оси спирали 3,4 А, они повернуты относительно друг друга на 36°. Таким образом, на один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует 34 А.
- На последовательность оснований в полинуклеотидной цепи не накладывается никаких ограничений. Определенная последовательность оснований несет конкретную генетическую информацию.

Описанная вторичная структура ДНК была расшифрована Уотсоном и Криком, это самая распространенная форма ДНК и она получила название В-формы. Существует несколько форм ДНК.

Таблица 4. Формы вторичной структуры ДНК

	А	В	Z	Р	Н
Расстояние между основаниями	0,29 нм	0,34 нм	0,77 нм		
количество оснований на виток	11-12	10	до 12		
положение оснований в спирали	под углом 20°	параллельно	под углом		
право или левозакрученная	Правозакрученная	Правозакрученная	Левозакрученная		
количество цепей	две	две	две	две	три
положение сахарофосфатного остова	снаружи основания обращены к оси	снаружи основания обращены к оси	снаружи основания обращены к оси	снаружи основания обращены от оси	внутри основания обращены к оси
где обнаружены	при обезвоживании	чаще всего	G/C-блоки	искусственно	G/C-блоки искусственно

РНК образована рибонуклеотидами, также состоящими из азотистого основания, пентозы и остатка фосфорной кислоты. Различия заключаются в том, что в РНК рибоза и составе азотистых оснований. Эти различия связаны с функциями РНК и ДНК. Наличие же рибозы в сахарофосфатном остове делает его менее стабильным (разрывы, накопление ошибок при передаче информации дочерним клеткам) но позволяет осуществлять каталитическую функцию. РНК в отличие от ДНК одноцепочечная и образует сложную вторичную и третичную структуры, что также позволяет осуществлять каталитическую функцию. Вторичные структуры РНК петля и спираль обеспечивают образование простых и сложных шпилек. Спирали РНК образованы комплементарными основаниями и по строению сходны с В-спиралью ДНК, то



есть сходны по структуре с В-формой ДНК, различие в том что

Рисунок 28: Вторичная структура РНК. А - структура тРНК; Б - структура рРНК

двойную спираль образуют не две отдельные цепи, а комплементарные и антипараллельные участки одной цепи РНК. Также следует отметить, что в образовании вторичной структуры РНК участвуют не только основные, но и минорные нуклеотиды, следовательно образуются как канонические, так и не канонические связи. Следует отметить, что образованные спирали, короче и составляют всего несколько десятков оснований и длина их зависит от длины комплементарных последовательностей нуклеотидов. В формировании спирали РНК Петли представляют собой неспаренные основания. В спиральях РНК возможно наличие неспаренных оснований, которые образуют выпетливания. Наиболее хорошо изучена вторичная структура тРНК, в виде структуры клеверного листа. В ней наблюдается три шпильки: антикодоновая,

псевдоуридиновая и дигидроуриновая, также аминокцепторный стебель и переменная петля. Переменная петля обеспечивает различия в длине молекул тРНК. РНК, принимая вторичную структуру, обеспечивает третичную более высокий уровень организации. В третичной структуре спирали или стебли взаимодействуют между собой или/и с одноцепочечными фрагментами или петлями, образуя более высоко организованные структуры. Также одной из форм третичной структуры является узел – в нем может участвовать несколько цепей РНК и взаимодействие обуславливается как комплементарными (Уотсон-Криковскими) так и хустиновскими взаимодействиями (аналогичные взаимодействия в Н-форме ДНК). Вторичная структура РНК обуславливает формирование третичной структуры, когда петли и шпильки образуют более сложную структуру. Наиболее подробно вторичная и третичная структуры изучены на примере тРНК. В тРНК 3 шпильки (D и Ψ антикодоновая) аминокцепторный стебель и две петли. Взаимодействие этих структур образует L-образную третичную структуру тРНК, более подробно структура тРНК будет рассмотрена в разделе “биосинтез белка”. Таким образом, структура РНК обуславливает многообразие ее функций.

Качественное определение ДНК и РНК

Для определения типа нуклеиновой кислоты необходимо идентифицировать сахар. Наиболее часто применяемыми методами являются колориметрические; их можно использовать для количественного определения углеводов как

таковых или,

соответственно

модифицировав методику,

для определения

нуклеиновых кислот,

нуклеотидов и других

производных.

Некоторые из методов

определения пентозы

основаны на

высвобождении фурфурола

после нагревания с HCl.

Фурфурол дает красное

окрашивание с ацетатом

анилина или желтое

окрашивание с п-

бромфенилгидразином.

Рибоза дает характерную

окраску после реакции с орцином в соответствующих условиях.

Если ДНК нагревать с дифениламином в кислом растворе, то наблюдается синее окрашивание. При реакции Фойльгена дезоксирибоза или ДНК после частичного кислотного гидролиза дают сине-фиолетовую окраску.

Гель-электрофорез

Молекулы нуклеиновых кислот заряжены отрицательно, следовательно в электрическом поле будут двигаться к положительному электроду. Если обеспечить перемещение через среду с ячейками, то есть гель с определенным размером ячеек, то линейные молекулы нуклеиновых кислот будут проходить через ячейки. Чем больше молекула, тем больше времени ей необходимо для прохождения через ячейки геля, следовательно чем короче молекула нуклеиновой кислоты тем дальше она сможет уйти в геле по сравнению с более длинной. Это метод позволяет разделить смесь нуклеиновых кислот по длине, а также при наличии смеси фрагментов с известными размерами и определить длину исследуемых фрагментов.

Плотность ДНК

Если концентрированные растворы хлорида цезия центрифугировать в аналитической ультрацентрифуге при высоких скоростях до установления равновесия между седиментацией и диффузией, создается стабильный градиент концентрации CsCl. Это соответствует увеличению плотности раствора в направлении центробежной силы. Формируемый градиент плотности пропорционален центробежной силе в соответствии с уравнением

$$dp/dr = \alpha \omega^2 r,$$

где ρ — плотность, являющаяся функцией от радиуса r (расстояние от центра вращения), ω — угловая скорость и α — константа, зависящая от природы соли. Если раствор CsCl содержит небольшое количество ДНК, то в условиях равновесия молекулы ДНК собираются в полосы в тех зонах ячейки для центрифугирования, где их плотность и плотность среды равны (изопикничны). Положение ДНК в ячейке может быть установлено по поглощению в ультрафиолетовой области, регистрируемому с помощью фотографии. Точно вычислив градиент плотности раствора вдоль ячейки, можно найти плотность образца ДНК. Эта техника называется изопикническим центрифугированием в градиенте плотности. Плавающая плотность ДНК находится в эмпирической зависимости от содержания G+C в молекуле:

$$\rho \text{ (г/см}^3\text{)} = 1,660 + 0,100 \text{ (содержание G + C)}$$

Это свойство позволяет фракционировать молекулы ДНК по содержанию в них G+C, а также по размеру молекулы.

Денатурация ДНК

Денатурация — разрушение вторичной структуры за счет распада водородных связей. В результате двойные спирали ДНК и РНК разрушаются, и образуются статистические клубки одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот.

Чаще всего используют температурную, но может быть и химическая (денатурирующие агенты мочевина, формамид и формальдегид). Температурная денатурация происходит под действием тепловой энергии сообщаемой при нагревании, в результате увеличивается частота и энергия колебаний и слабые водородные связи разрушаются. При химической денатурации молекулы денатурирующего агента конкурируют за водородные связи и азотистые основания взаимодействуют не друг с другом, образуя вторичную структуру, а с денатурирующими агентами.

Температура при которой денатурирована половина молекул — **температура плавления**

Температура плавления зависит от длины молекулы и ее G/C состава, так как чем больше водородных связей нужно разорвать, тем больше энергии необходимо сообщить системе, а, следовательно, больше нагреть. Чем больше длина молекулы, тем больше нуклеотидов, образует вторичную структуру, а также больше водородных связей во вторичной структуре. При взаимодействии аденина с тиминном две связи, гуанина с цитидином три, каждая пара G/C дает на одну связь больше, и увеличивается количество поглощенной энергии. Определение температуры плавления следует проводить при фиксированной ионной силе и рН, так как эти факторы существенно влияют на стабильность ДНК. Значение $T_{пл}$ можно снизить, добавляя мочевину — реагент, разрушающий водородные связи и препятствующий гидрофобным взаимодействиям. Например, в 8 М мочеvine $T_{пл}$ снижается до 20°C. В 95%-ном формамиде ДНК полностью разделяется на две нити при комнатной температуре. Аналогично в кислых растворах вблизи рН 2—3, при которых протонируются аминогруппы, спираль разрушается. Степень денатурированности ДНК определяется несколькими способами.

Поглощение в УФ-области

Все нуклеиновые кислоты сильно поглощают свет в УФ-области с максимумом 260 нм. Когда нативность ДНК нарушается, наблюдается заметный **гиперхромный эффект** — увеличение поглощения. Это изменение отражает уменьшение числа водородных связей и отмечается не только для ДНК, но и для РНК и синтетических полинуклеотидов, которые имеют стабилизируемую водородными связями структуру.

Оптическое вращение

Нативная ДНК обладает сильным положительным вращением плоскости поляризации света, которая заметно уменьшается при денатурации.

Вязкость

Растворы нативной ДНК имеют высокую вязкость, что является следствием наличия относительно жесткой двуспиральной и вытянутой стержнеподобной структуры ДНК. Разрушение водородных связей приводит к заметному уменьшению вязкости.

Ренатурация ДНК

Денатурация ДНК — процесс обратимый. Если ДНК только частично денатурирована, например, при нагревании, то при снижении температуры происходит быстрая ренатурация каждой молекулы ДНК, скорость которой соответствует реакции первого порядка. Если ДНК полностью денатурирована, две комплементарные нити будут реассоциировать медленно («отжиг» ДНК). Этот процесс включает две стадии: сначала по реакции второго порядка происходит сборка комплементарных последовательностей двух нитей, а затем по реакции первого порядка — быстрое их «защелкивание». Если начальная концентрация денатурированной ДНК - C_0 (молярная концентрация фосфата ДНК), то изменение концентрации C одноцепочечной ДНК во времени

подчиняется уравнению реакции второго порядка $dc/dt = -K_2 C^2$, интегральная форма которого $C/C_0 = 1/(1 + K_2 C_0 t)$. Скорость ренатурации обычно оценивается по графику зависимости C/C_0 от $\lg C_0 t$. Построив график, можно найти $C_0 t_{1/2}$, где $t_{1/2}$ — время, при котором $C/C_0 = 0,5$, а также константу скорости реакции второго порядка K_2 , равную $1/C_0 t_{1/2}$. Константа K_2 — характеристический параметр для данной ДНК; она обратно пропорциональна N — числу пар оснований ДНК (если ДНК не имеет повторяющихся последовательностей). $C_0 t_{1/2}$ прямо пропорционально N (N называется сложностью ДНК). Этот метод позволяет определить для бактериальных и вирусных ДНК значения N , согласующиеся со значениями, полученными другими методами.

Липиды и мембраны

Если животную или растительную ткань последовательно обрабатывать одним или несколькими органическими растворителями, например этанолом, эфиром, хлороформом, бензолом или петролейным эфиром, то некоторая часть материала перейдет в раствор. Компоненты такой растворимой фракции (вытяжки) называются липидами.

Классификация липидов

Липидная фракция содержит вещества различных типов, которые могут быть классифицированы следующим образом:

- I. Жирные кислоты
- II. Глицеринсодержащие липиды
 - а) нейтральные жиры
 - 1) моно-, ди- и триацилглицерины
 - 2) простые эфиры глицерина
 - 3) гликозилглицериды
 - б) фосфоглицериды
 - 1) фосфатиды
 - 2) дифосфатидилглицериды и фосфоинозитиды
- III. Липиды, не содержащие глицерин
 - а) сфинголипиды
 - 1) церамиды
 - 2) сфингомиелины
 - 3) гликосфинголипиды
 - б) алифатические спирты и воска
 - в) терпены
 - г) стероиды
- IV. Липиды, связанные с веществами других классов
 - а) липопротеины
 - б) протеолипиды

Из-за гетерогенности входящих в липидную фракцию компонентов термин «липидная фракция» нельзя рассматривать как структурную характеристику; он является лишь рабочим лабораторным названием фракции, получаемой при экстракции биологического материала малополярными растворителями. Однако большинство липидов имеет некоторые общие структурные особенности, обуславливающие их важные биологические свойства так же, как и сходную растворимость. В большинстве случаев они являются ионными или полярными производными углеводов и принадлежат к классу веществ, называемых амфифилами или бифилами. Амфифилы [*amphi* (греч.) — оба; *phyle* (греч.) — сродство] содержат полярные или ионные гидрофильные группировки, а также гидрофобные неполярные углеводородные группировки. Свойства амфифилов в значительной степени определяются природой этих группировок. Так, некоторые липиды, такие, как нейтральные жиры, очень слабополярны и, как следствие, имеют очень низкое сродство к воде. Они хранятся в клетках, как правило, в безводном состоянии и служат энергетическими «резервуарами». Другие липиды, такие, как фосфолипиды и сфинголипиды, более полярны; вследствие выраженных амфифильных свойств они являются основными структурными компонентами различных биологических мембран, служащих своеобразными «перегородками» в живой материи. Таким образом, рассмотрение структуры и свойств различных липидов очень важно для понимания их разнообразных биологических функций.

Жирные кислоты

Биологически важные жирные кислоты характеризуются следующими особенностями:

являются, как правило, монокарбоновыми кислотами, содержащими одну ионизируемую карбоксильную группу и неполярную углеводородную цепь; обычно содержат четное число атомов углерода, хотя в природе встречаются также и жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов; в состав жирных кислот входит от 12 до 26 атомов углерода; представляют собой либо насыщенные соединения, либо соединения с одной или несколькими двойными связями.

Общая формула жирных кислот: RCOON .

Где R — углеводородный радикал имеющий разнообразную структуру, по которой жирные кислоты можно классифицировать на:

А. Насыщенные жирные кислоты

Насыщенные жирные кислоты являются членами гомологического ряда, начинающегося с уксусной кислоты. Углеводородный радикал полностью насыщен, то есть не содержит ни двойных, ни тройных связей, ни других группировок. Существуют и другие члены ряда, с большим числом углеродных атомов, они встречаются в первую очередь в восках. Было выделено — как из растительных, так и из животных организмов несколько жирных кислот с разветвленной цепью. При нумерации углеродных атомов первым считается углерод карбоксильной группы (С-1). В типичных липидах

животного происхождения преобладающей насыщенной жирной кислотой является пальмитиновая (C_{16}), второе место занимает стеариновая кислота (C_{18}). Более короткие жирные кислоты (C_{14} и C_{12}), так же как и более длинные (до C_{28}), встречаются лишь в небольших количествах. Жирные кислоты, содержащие 10 или меньше углеродных атомов, вообще редко встречаются в животных липидах.

Б. Ненасыщенные жирные кислоты.

В названиях этих соединений по женеvской номенклатуре число углеродных атомов в молекуле указывается таким же способом, что и для соответствующих насыщенных кислот (с помощью греческих числительных), а число двойных связей — с помощью суффиксов («ен» — одна, «диен» — две, «триен» — три связи и т. д.). Положение двойной связи обозначается номером ближайшего к карбоксильной группе атома углерода, участвующего в образовании этой связи. Так, например, двойная связь в цис-9-гексадеценовой кислоте находится между девятым и десятым углеродными атомами, а двойные связи в цис-9,12-октадекадиеновой кислоте расположены между 9—10 и 12—13 атомами углерода. Одиночная двойная связь в жирных кислотах животного происхождения обычно находится в 9,10-положении. Двумя преобладающими мононенасыщенными жирными кислотами животных липидов являются олеиновая ($C_{18:1\Delta^9}$) и пальмитоолеиновая. Олеиновая кислота является более широко распространенной в природе и превалирует в количественном отношении. Так же известны и распространены линоленовая с тремя двойными связями и арахидоновая кислота ($C_{20:4\Delta^5; 8; 11; 14}$) с четырьмя двойными связями.

Ненасыщенные жирные кислоты подразделяют в соответствии со степенью ненасыщенности.

1. Мононенасыщенные (моноэтенонидные, моноеновые) кислоты.

2. Полиненасыщенные (полиэтенонидные, полиеновые) кислоты.

3. Эйкозаноиды. Эти соединения, образующиеся из эйкоза-(20C)-полиеновых жирных кислот, подразделяются на **простаноиды** и **лейкотриены (ЛТ)**. Простаноиды включают **простагландины (ПГ)**, **простациклины (ПГ-1)** и **тромбоксаны (ТО)**. Иногда термин простагландин употребляется в менее строгом смысле и означает все простаноиды.

Простагландины были первоначально обнаружены в семенной жидкости, но затем найдены в составе практически всех тканей млекопитающих; они обладают целым рядом важных физиологических и фармакологических свойств. Они синтезируются *in vivo* путем циклизации участка в центре углеродной цепи 20^0C (эйкозановых) полиненасыщенных жирных кислот (например, арахидоновой кислоты) с образованием циклопентанового кольца. Родственная серия соединений, **тромбоксаны**, обнаруженные в тромбоцитах, содержат циклопентановое кольцо, в которое включен атом кислорода (оксановое кольцо). Три различные эйкозановые жирные кислоты приводят к образованию трех групп эйкозаноидов,

различающихся числом двойных связей в боковых цепях — ПГ₁ ПГ₂ и ПГ₃. К кольцу могут быть присоединены различные группы, дающие на и тромбоксанов, которые обозначаются А, В и т. д. Например, простагландин Е-типа (ПГ-Е₂) содержит кетогруппу в положении 9, тогда как в простагландине F-типа в этом же положении стоит гидроксильная группа. Лейкотриены являются третьей группой эйкозаноидных производных, они образуются не путем циклизации жирных кислот, а в результате действия ферментов липоксигеназного пути. Они были впервые найдены в лейкоцитах и характеризуются наличием трех сопряженных двойных связей.

4. Другие ненасыщенные жирные кислоты. В материалах биологического происхождения были найдены и многие другие жирные кислоты, содержащие, в частности, гидроксильные группы (рицинолевая кислота) или циклические группы.

В. Другие жирные кислоты

В некоторых бактериях и растениях были найдены жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо, в качестве примера можно привести лактобацилловую и стрекуловую кислоты. Биосинтез таких кислот происходит путем переноса метиленовой группы от S-аденозилметионина на двойную связь моноеновых кислот. Наконец, в природных липидах встречаются и гидроксикислоты входящие, как правило, в состав липидов бактериальных клеток. Их представителями являются 2(3)-гидроксипальмитиновая, 2(3)-гидроксистеариновая и 2-гидроксилигноцериновая (цереброновая) кислоты. В некоторых бактериях и растениях были найдены жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо, в качестве примера можно привести лактобацилловую и стрекуловую кислоты. Биосинтез таких кислот происходит путем переноса метиленовой группы от S-аденозилметионина на двойную связь моноеновьо кислот.

Цис/транс-изомерия ненасыщенных жирных кислот

Углеродные цепи насыщенных жирных кислот имеют форму зигзагообразной линии, когда они вытянуты (как это имеет место при низких температурах). При более высоких температурах происходит поворот вокруг ряда связей, приводящий к укорочению цепей,— именно поэтому при повышении температуры биомембраны становятся тоньше. У ненасыщенных жирных кислот наблюдается **геометрическая изомерия**, обусловленная различием в ориентации атомов или групп относительно двойной связи. Если ацильные цепи располагаются с одной стороны от двойной связи, образуется цис-конфигурация, характерная, например, для олеиновой кислоты, если же они располагаются по разные стороны, то молекула находится в трансконфигурации, как в случае элаидиновой кислоты — изомера олеиновой кислоты. Природные полиненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты почти все имеют цис- конфигурацию; на участке, где находится двойная связь, молекула «согнута» и образует угол в 120°. Таким образом, олеиновая кислота

имеет форму буквы Г, тогда как элаидиновая кислота на участке, содержащем двойную связь, сохраняет «линейную» трансконфигурацию. Увеличение числа *цис*-двойных связей в жирных кислотах ведет к увеличению числа возможных пространственных конфигураций молекулы. Это может оказывать большое влияние на упаковку молекул в мембранах, а также на положение молекул жирных кислот в составе более сложных молекул, таких, как фосфолипиды. Наличие двойных связей в транс-конфигурации изменяет эти пространственные соотношения. Жирные кислоты в транс-конфигурации присутствуют в составе некоторых пищевых продуктов. Большинство из них образуется как побочные продукты в процессе гидрогенизации, благодаря которому жирные кислоты переходят в насыщенную форму; таким способом, в частности, добываются «затвердевания» природных масел при производстве маргарина. Кроме того, еще некоторое небольшое количество транс-кислот поступает с животным жиром — он содержит транс-кислоты, образовавшиеся под действием микроорганизмов, присутствующих в рубце жвачных животных.

Физические свойства жирных кислот

Поглощение света

Жирные кислоты не поглощают ни в видимой, ни ультрафиолетовой части спектра света.

Температуры плавления

Температуры кипения и плавления жирных кислот возрастают с увеличением длины углеводородной цепи. Насыщенные жирные кислоты с четным числом углеродных атомов являются при комнатной температуре жидкостями, если общее число углеродных атомов меньше 10, или твердыми, если углеродная цепь более длинная. Ненасыщенность жирных кислот *цис*-ряда существенно влияет на их свойства. Так, с увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот, возрастает их растворимость в неполярных растворителях. Все обычные ненасыщенные жирные кислоты, встречающиеся в природе, при комнатной температуре — жидкости.

Растворимость

Жирные кислоты являются амфифилами, то есть имеют гидрофильную карбоксильную группу и гидрофобный в то или иной степени хвост.

Химические свойства жирных кислот

Кислотно-основные свойства жирных кислот

Жирные кислоты являются слабыми кислотами и диссоциируют в водных растворах, значения констант диссоциации для всех насыщенных жирных кислот очень близки между собой ($pK=4,85$), а также соответствующей константе уксусной кислоты ($pK=4,76$). Исключение составляет первый член этого ряда — муравьиная кислота ($pK=3,75$). Таким образом, в водных растворах неионизированная форма жирной кислоты ($RCOOH$) является преобладающей при $pH < pK$, тогда как ионизированная форма ($RCOO^-$) преобладает при $pH > pK$.

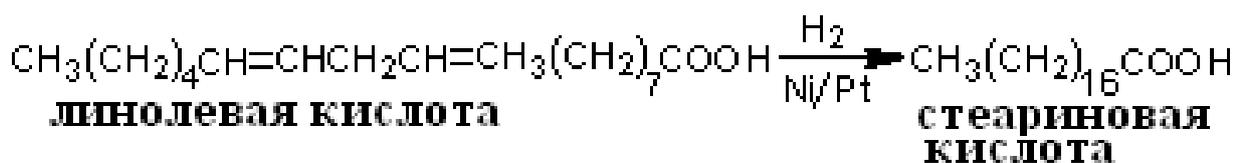
Этерификация

Этерификация — наиболее известная реакция с участием карбоксильной группы; в ходе этерификации молекулы кислоты и спирта обратимо реагируют с образованием эфира и воды. В отсутствие катализатора эта реакция протекает чрезвычайно медленно. Однако скорость ее возрастает с увеличением температуры или концентрации ионов водорода, а также при увеличении обоих этих параметров.

Другие химические свойства жирных кислот

Реакции по двойным связям

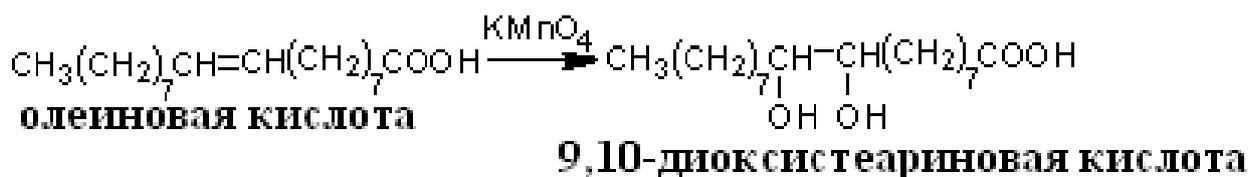
Реакции по двойным связям жирных кислот включают присоединение водорода или галогена, а также окисление различными реагентами. Ненасыщенные



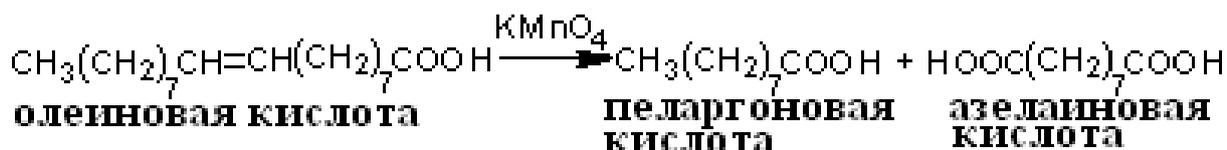
жирные кислоты или их эфиры могут быть легко гидрированы газообразным водородом в присутствии катализаторов, например тонкоизмельченной платины, палладия или активированного никеля. Если восстановление осуществляется до полного насыщения, то такие ненасыщенные жирные кислоты, как линолевая и линоленовая, количественно превращаются в стеариновую кислоту. Галогены (например, Br₂) легко присоединяются по двойным связям жирных кислот и их эфиров. В подходящих растворителях эта реакция протекает самопроизвольно и в большинстве случаев до конца.

Окисление

В то время как насыщенные жирные кислоты относительно устойчивы к



окислению, ненасыщенные кислоты легко могут быть окислены. Окисление медленно и самопроизвольно происходит под действием воздуха и является



частью процесса, называемого **прогорканием** масла. Предполагается, что в этой реакции двойные связи атакуются пероксидными радикалами с образованием неустойчивых гидропероксидов, которые разлагаются с образованием кето- и окикето-кислот. Окисление по двойным связям происходит значительно быстрее в присутствии озона O₃. Предполагается, что

вначале образуются нестойкие озониды, которые затем в восстановительных условиях гидролизуются с образованием двух альдегидных групп. Эта реакция используется для установления положения двойной связи в цепях жирных кислот. Идентификация фрагментов, полученных в результате озонлиза и последующего гидролиза в окислительных условиях, также позволяет сделать заключение о структуре исходной жирной кислоты. С этой целью может быть проведено также окисление перманганатом калия. В мягких условиях двойные связи окисляются с образованием гликолей. В жестких условиях тот же реагент расщепляет молекулу по двойной связи с образованием карбоксильных групп по месту расщепления

Функции жирных кислот

Жирные кислоты за исключением эйкозаноидов практически не встречаются в свободном состоянии это и определяет их функции.

1. Жирные кислоты входят в состав и частично определяют физические свойства большинства других липидов

2. Эйкозаноиды являются регуляторными молекулами: простагландины участвуют в регуляции воспаления (ингибиторы синтеза простагландинов являются противовоспалительными и как следствие обезболивающими препаратами, на пример, Naise и Кеторол), а так же других иммунных процессов, также протагландины регулируют артериальное давление и гемопозз, это позволяет предполагать что спектр их регуляторных функций очень велик. Обнаруженные на поверхности лейкоцитов лейкотриены также участвуют в регуляции иммунных ответов. Тробоксаны участвуют в регуляции гемостаза и свертывания крови. Из всего выше сказанного можно заключить, что эйкозаноиды участвуют в регуляции множества процессов, и весь их спектр пока не известен.

Липиды, содержащие глицерин

Нейтральные жиры или Моно-, ди- и триацилглицерины

Нейтральные жиры — наиболее распространенная в природе группа липидов. Эти соединения являются эфирами жирных кислот и глицерина. Одна, две или три гидроксидные группы глицерина могут быть этерифицированы жирной кислотой с образованием моно-, ди- и триацилглицеринов соответственно. Термины «моно-, ди- и триглицериды» часто применяются для обозначения таких эфиров глицерина, однако они не являются химически строгими. Общая формула триацилглицеринов, где R, R' и R" — остатки одинаковых или разных жирных кислот, связанных с глицерином сложноэфирной связью. Номенклатура нейтральных жиров основывается на названиях жирных кислот, входящих в их состав. Так, например, тристеарин содержит в одной молекуле три остатка стеариновой кислоты, а олеодистеарин — один остаток олеиновой и два остатка стеариновой кислоты. Триацилглицеролы, содержащие остатки одинаковых жирных кислот во всех трех положениях, называют **простыми**

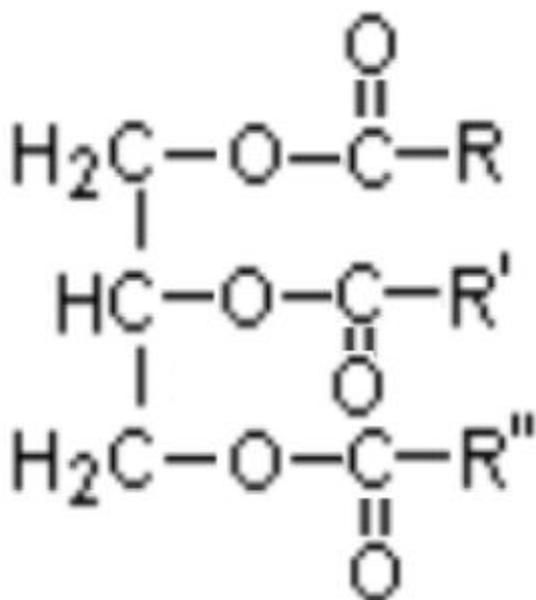


Рисунок 29: Структурная формула триацилглицерола (триацилглицерида)

различающиеся как по длине цепи, так и по степени насыщенности.

триацилглицеролами; их название определяется названием жирной кислоты. Так, например, тристеароилглицерол, трипальмитоилглицерол и триолеилглицерол содержат соответственно остатки стеариновой, пальмитиновой и олеиновой кислот. Чаще пользуются тривиальными названиями этих соединений, а именно: тристеарин, трипальмитин, триолеин. Триацилглицеролы, содержащие два либо все три разных остатка жирных кислот, называют **смешанными триацилглицеролами.** Большинство природных жиров, таких, как оливковое или сливочное масло и другие пищевые жиры, содержат сложные смеси простых и смешанных триацилглицеролов, в состав которых входят жирные кислоты,

Физические свойства триацилглицеридов

Нейтральные жиры являются слабыми амфифилами, они намного более гидрофобны, чем жирные кислоты, поскольку эфирные связи, так же как и свободные гидроксидные группы в моно- и диацилглицеринах, не ионизированы и являются слабополярными. Таким образом, свойства этих веществ определяются главным образом наличием в их молекулах гидрофобных алкильных групп. Жиры нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в неполярных растворителях.

Триацилглицеролы, содержащие остатки только насыщенных жирных кислот, при комнатной температуре имеют консистенцию твердого вещества. Примером может служить тристеарин основной компонент говяжьего сала. Триацилглицеролы, содержащие три ненасыщенные жирные кислоты (например, триолеин - основной компонент оливкового масла), при комнатной температуре находятся в жидком состоянии. Сливочное масло представляет собой смесь триацилглицеролов, причем в состав некоторых из них входят жирные кислоты с относительно короткими цепями; поскольку с укорочением цепи жирной кислоты температура ее плавления снижается, сливочное масло при комнатной температуре имеет мягкую консистенцию. Чем жир богаче остатками короткоцепочечных и ненасыщенных жирных кислот, тем выше его растворимость и ниже температура плавления. Насыщение и увеличение длины цепей приводят к возрастанию температуры плавления; так, при комнатной температуре тристеарин представляет собой твердое вещество (т. пл. 71°C), тогда как триолеин (т. пл. —17°C) и трибутирин (т. пл. —75°C) —жидкости. Большинство животных жиров преимущественно содержит в различных соотношениях эфиры пальмитиновой, стеариновой, пальмитоолеиновой,

олеиновой и линолевой кислот. Жиры из различных тканей одного и того же организма могут существенно различаться по составу. Так, подкожный жир человека более богат насыщенными жирными кислотами, чем жир печени, который в свою очередь содержит больше ненасыщенных жирных кислот. Жиры масла или молока по сравнению с другими жирами содержат наибольшее количество короткоцепочечных жирных кислот. Подкожные жиры различных млекопитающих существенно различаются по степени ненасыщенности остатков жирных кислот, о чем можно судить по разнице их температур плавления. У говяжьего жира она довольно высока, а свиное сало плавится при гораздо более низкой температуре.

Растительные жиры (масла) также весьма разнообразны по составу жирных кислот, которые различаются как длиной углеводородных цепей, так и степенью их ненасыщенности. При комнатной температуре многие из них являются жидкостями.

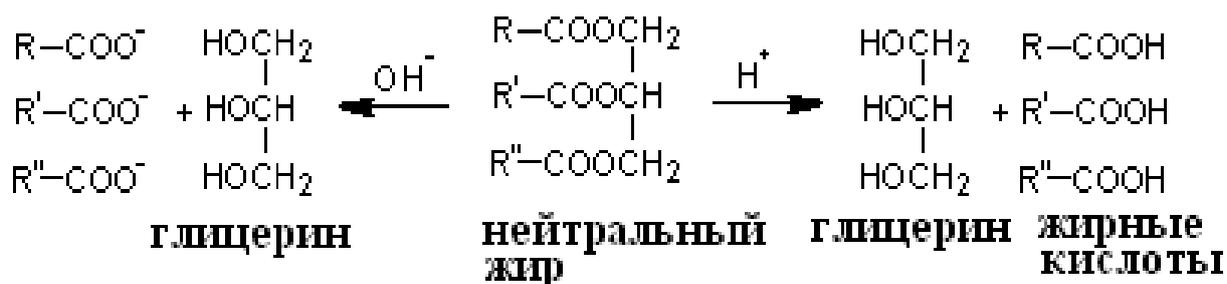
Химические свойства

Гидролиз и омыление

Триацилглицериды вступают в реакцию гидролиза в кислых условиях, в результате образуются 3 молекулы жирной кислоты и глицерин.

Эта реакция протекает довольно медленно в кипящей воде, но значительно ускоряется каталитическими концентрациями H^+ . В животных и растительных тканях эта реакция катализируется ферментами, называемыми **эстеразами** или, более точно, **липазами**.

Расщепление нейтральных жиров щелочами (OH^-) называется **омылением**. Освобождающиеся в результате реакции карбоксилатные ионы ($R-COO^-$) в присутствии катионов образуют мыла. Если использовалась калиевая щелочь то



образуется жидкое мыло, если натриевая, то твердое. Реакция необратима; карбоксилатные ионы не вступают в реакцию рекомбинации с гидроксидными группами глицерина. Протеканию реакции омыления благоприятствует то, что первые порции образовавшегося мыла действуют как детергент. Конечные продукты реакции — мыла и глицерин — растворимы в воде и нерастворимы в неполярных растворителях, например в эфире. Это обстоятельство часто используется в химии липидов при разделении смеси веществ. **Омыляемая фракция** определяется как часть суммарного липида, которая после обработки горячей щелочью становится растворимой в воде и нерастворимой в эфире. Нейтральные жиры, таким образом, являются омыляемыми.

Другие химические свойства триацилглицеролов определяются структурой и свойствами входящих в их состав жирных кислот. В этом случае в реакции вступают углеводородные радикалы жирных кислот. Соответственно триацилглицериды вступают в те же реакции что и жирные кислоты. Восстановление — производство маргарина. Окисление — прогоркание масла.

Функции триацилглицеридов

Триацилглицеролы - основной компонент жировых депо растительных и животных клеток. В мембранах они не содержатся. Важно отметить, что триацилглицеролы - это неполярные, гидрофобные вещества, поскольку они не содержат заряженных или сильно полярных функциональных групп. В большинстве растительных и животных клеток триацилглицеролы находятся в цитозоле в виде мелкодисперсных эмульгированных маслянистых капелек. В специализированных клетках соединительной ткани животных, а именно в **адипоцитах**, или **жировых клетках**, огромное количество триацилглицеролов может запасаться в виде жировых капелек, заполняющих почти весь объем клетки. В большом числе жировые клетки обнаруживаются под кожей, в брюшной полости и в молочных железах.

Триацилглицеролы выполняют следующие функции:

1. Энергетическая. Это более компактный и эффективный источник энергии чем углеводы. При окислении липидов выделяется в два раза больше энергии, чем при окислении углеводов. Кроме того они более стабильны так как могут накапливаться в очень больших количествах в практически чистом, негидратированном виде. Поэтому животные, тратящие много энергии на двигательную и другие виды активности, используют как основной запас энергии именно триацилглицеролы. У тучных людей в жировых клетках накапливаются килограммы триацилглицеролов, энергии которых могло бы хватить на обеспечение основного обмена организма в течение нескольких месяцев. В отличие от этого в форме гликогена организм может запастись энергией не более чем на сутки.

2. Источник эндогенной воды. При окислении липидов выделяется много воды, поэтому животные пустынь, например, верблюды запасают большие количества жира, при окислении которого они получают и энергию и воду, так как жиры гидрофобны они не влияют на водный баланс. Постепенное окисление позволяет пополнять затраченные количества воды в организме, также не нарушая водного баланса организма. То же касается животных, впадающих в сезонные спячки (медведи, ежи и др).

3. Механическая защита. Откладываясь в подкожной жировой клетчатке на ступнях и ладонях образует амортизирующую прокладку, защищающую кости от ударов при ходьбе.

4. Термическая защита. Образует теплоизолирующую прокладку уменьшая теплоотдачу организма и защищая организм от действия очень низких температур (Тюлени, моржи, пингвины и другие теплокровные животные Арктики),.

5. Химическая защита. Гидрофобные чужеродные вещества депонируются в жировых каплях, в результате изолируются от других клеток организма.

Простые эфиры глицерина и гликозилглицериды

Нейтральные липиды, называемые **алкиловыми эфирами глицерина**, были выделены из опухоли человека и бычьих эритроцитов. В этих соединениях длинноцепочечный (насыщенный или ненасыщенный) спирт и глицерин связаны простой эфирной связью. Имеющиеся данные позволяют предположить, что в природе эти липиды находятся не в свободном состоянии, а в виде этерифицированных производных длинноцепочечных жирных кислот, называемых **алкильными диацилглицеринами**.

Гликозилдиацилглицериды были выделены из растений и бактерий. Один из представителей липидов этого типа, выделенный из хлоропластов и хроматофоров фотосинтезирующих бактерий, содержит 6-сульфо-6-дезоксиглюкозу (хиновозу), связанную гликозидной связью с диацилглицерином. Биологическая роль липидов этого типа еще не установлена.

Полярные липиды

Эта группа глицеринсодержащих липидов включает производные L-глицеро-3-фосфата. В основе их классификации лежит тип связи между углеводородной частью молекулы и глицерином, а также природа полярных групп (помимо фосфата) в молекуле. Биологическая роль этих амфифильных молекул весьма велика, так как именно они составляют до 50% всех липидов биологических мембран.

Фосфолипиды

К фосфолипидам относятся 1) фосфатидная кислота и фосфатидилглицеролы, 2) фосфатидилхолин, 3) фосфатидилэтаноламин, 4) фосфатидилинозитол, 5) фосфатидилсерин, 6) лизофосфолипиды, 7) плазмалогены и 8) сфингомиелины. Фосфатидная кислота и фосфатидилглицеролы

Фосфоглицериды широко распространены в растениях, животных и микроорганизмах и могут рассматриваться как производные L-фосфатидной кислоты (1,2,-O-диацил-L-глицеро-3-фосфата). Среди соединений этой группы наиболее часто встречаются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, содержащие азотистое основание холин, этаноламин и серии соответственно. Фосфатидилхолины называют также *лецитинами*. У большинства природных фосфатидов насыщенные жирные кислоты (C₁₆—C₁₈) находятся обычно в положении С-1, а ненасыщенные жирные кислоты (C₁₆—C₂₀), содержащие от одной до четырех двойных связей, — в положении С-2, хотя известны исключения из этого правила.

Физические и химические свойства фосфолипидов

При физиологических значениях pH фосфатиды являются диполярными ионами и существуют преимущественно в виде ионных форм, изображенных выше. Таким образом, ионизированные группы образуют высокополярную гидрофильную часть молекулы, тогда как две ацильные группировки образуют

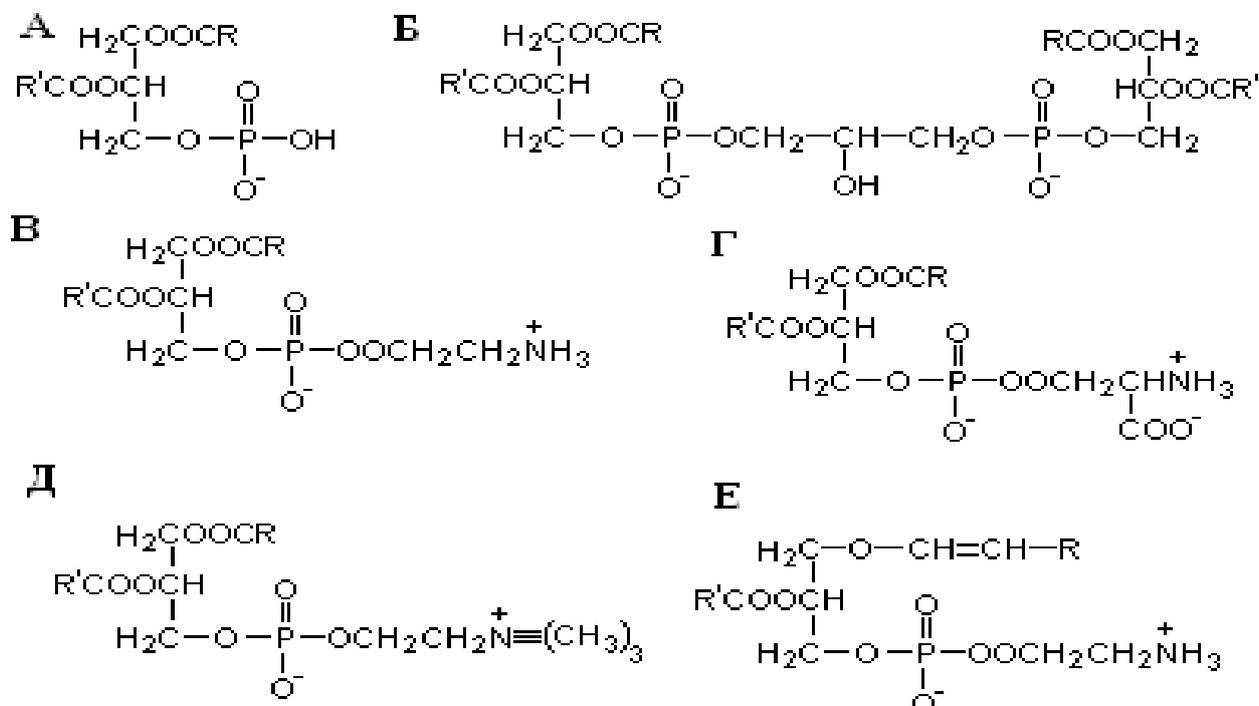


Рисунок 30: Структурные формулы фосфолипидов и плазмалогенов: А - фосфатидная кислота; Б - кардиолипин; В - фосфатидилэтаноламин; Г - фосфатидилсерин; Д - фосфатидилхолин; Е - плазмалоген

ее гидрофобную часть. Функциональные группы этаноламина и серина имеют следующие значения рК: серии 9,15 (аминогруппа) и 2,25 (карбоксильная группа); этаноламин 9,5 (аминогруппа). Холин (гидроксид В-оксиэтилтриметиламмония) является таким же сильным основанием, как КОН, и полностью диссоциирует в воде с образованием ионов холина и гидроксила. Температура плавления обеспечивается жирными кислотами, входящими в состав фосфолипидов, как и в случае триацилглицеролов.

Фосфоглицериды вступают в те же реакции, что и триацилглицеролы, то есть в реакции гидролиза и омыления, а также в реакции по углеводородным хвостам жирных кислот.

Функции фосфолипидов

1. **Лизофосфолипиды.** Эту группу соединений образуют фосфоацилглицеролы, содержащие только один ацильный радикал. Примером служит лизолецитин, играющий важную роль в метаболизме фосфолипидов. Фосфатидная кислота является важным прометуточным соединением в ходе

синтеза триацилглицеролов и фосфолипидов, но в тканях содержится в незначительных количествах.

2. Все остальные липиды кроме лизофосфолипидов и фосфатидной кислоты входят в состав мембран. Но в составе мембран они могут выполнять дополнительные функции, которые зависят от типа фосфолипида и будут рассмотрены ниже. Но в составе мембран они могут обеспечивать

3. **Фосфатидилхолин (лецитин).** Лецитины, как и простые жиры, содержат глицерол и жирные кислоты, но в их состав еще входят фосфорная кислота и холин. Лецитины широко представлены в клетках различных тканей, они выполняют как метаболические, так и структурные функции в мембранах. Дипальмитиллецитин — очень эффективный поверхностно-активный агент, снижающий поверхностное натяжение и тем самым препятствующий слипанию внутренних поверхностей дыхательных путей в легких. Его отсутствие в легких недоношенных новорожденных приводит к развитию **синдрома дыхательной недостаточности**. Большинство фосфолипидов содержит насыщенный ацильный радикал в положении С1, и ненасыщенный радикал в положении С2.

4. **Фосфатидилэтаноламин (кефалин).** Кефалины отличаются от лецитинов только тем, что у них холин заменен этаноламином.

5. **Фосфатидилинозитол.** Другая группа не содержащих азот производных α -фосфатидной кислоты содержит инозит. При гидролизе 1 моля фосфоинозотида обычно получается 1 моль глицерина, 1 моль шестиатомного спирта миоинозита, 2 моля жирной кислоты и 1—3 моля фосфата. 4-Дифосфо- и 4,5-трифосфоинозитиды присутствуют в тканях мозга и составляют более половины всех фосфоинозитидов. Трифосфоинозитид, 1-фосфатидилмиоинозит-4,5-дифосфат. Инозитол в этом соединении представлен одним из стереоизомеров — миоинозитолом. Миоинозит является одной из девяти стереоизомерных форм карбоциклического шестиатомного спирта и принадлежит к классу веществ, называемых циклитолами, которые являются циклоалканами, содержащими по одной гидроксидной группе у каждого из трех или более атомов углеродного кольца. Миоинозит является важнейшим циклитолом, широко распространенным в различных микроорганизмах, высших растениях и животных. В растениях он обнаружен в виде его гексафосфата — фитиновой кислоты или в виде ее магниевое-кальциевой соли — фитина. Биохимический интерес к миоинозиту обусловлен его ролью в питании, а также в процессах липидного и углеводного метаболизма. Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат является важным компонентом фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран; при стимуляции соответствующим гормоном он расщепляется на **диацилглицерол** и **инозитолтрифосфат** — оба этих соединения действуют как внутриклеточные, или вторые посредники.

6. **Фосфатидилсерин** В тканях находится также родственный кефалину фосфолипид, содержащий вместо этаноламина остаток серина. Хотя фосфатидилсерин входит в состав мембран практически всех прокариотических и эукариотических клеток, однако, как правило, он является минорным мембранным компонентом. Больше всего фосфатидилсерина в мозге

млекопитающих (около 15% от общего количества фосфолипидов), в тканях других органов, таких как сердце, печень, почки, селезенка и легкие, содержание его составляет менее 10%. Фосфатидилсерин играет важную роль в жизнедеятельности клеток, являясь регулятором активности целого ряда мембраносвязанных ферментов. Во многих клетках фосфатидилсерин может выступать в качестве предшественника при биосинтезе фосфатидилэтаноламина, превращаясь в последний под действием мембранного фермента — фосфатидилсериндекарбоксилазы. Кроме того, были выделены фосфолипиды, содержащие остаток треонина.

7. **Дифосфатидилглицерины** Как и следует из названия, дифосфатидилглицерины животных и растительных тканей содержат 1 моль глицерина и 2 моля L-фосфатидной кислоты (на 1 моль дифосфатидилглицерина). Общая формула этих соединений показана ниже. Важным представителем соединений этой группы, присутствующих в тканях животных, является **кардиолипин**, выделенный впервые из сердечной ткани. **Кардиолипин** — фосфолипид, содержащийся в мембранах митохондрий. Это пока единственный фосфатид с известными иммунологическими свойствами. Соединения, сходные по структуре с описанными выше, обнаружены также и в растительных тканях. Однако фосфатиды растений содержат только 1 моль фосфатидной кислоты и являются, поэтому монофосфатидилглицеринами. Все эти соединения различаются структурой жирных кислот, входящих в их состав. Он образуется из **фосфатидилглицерола**.

Плазмалогены

Эти фосфоглицериды содержат α,β -ненасыщенный спирт, образующий простую эфирную связь в положении С-1 L-глицеро-3-фосфата (в отличие от сложноэфирной связи, образуемой остатком жирной кислоты). Фосфатидальхолины, фосфатидальэтаноламины и фосфатидальсерины — три основных класса плазмалогенов. Простые эфирные связи α,β -ненасыщенных спиртов в этих соединениях стабильны в разбавленных щелочах, однако в разбавленных кислотах они гидролизуются с образованием альдегида соответствующего α,β -ненасыщенного спирта. α,β -Ненасыщенные спирты имеют *цис*-конфигурацию и длину цепи от C_{12} до C_{18} . В чистом фосфатидальхолине из бычьего сердца остаток жирной кислоты в положении С-2, как правило, является ненасыщенным, тогда как спиртовый остаток в С-1-положении является обычно насыщенным (исключение составляет лишь α,β -двойная связь). В тканях животных были обнаружены плазмалогены, не содержащие азотистых оснований, а также подобные триацилглицеринам нейтральные плазмалогены, содержащие две сложноэфирные связи и одну простую эфирную связь, образованную α,β -ненасыщенным спиртом в С-1-положении (1-алкенил-2,3-диацилглицерин). Производные 1-алкил-2-ацилфосфатидилхолина широко распространены в животных тканях. Эти соединения имеют общую формулу. Хотя содержание этих веществ в живых организмах составляет лишь несколько процентов общего количества

фосфоглицеридов, они обнаружены в значительных количествах в эритроцитах, а в тканях некоторых беспозвоночных их содержание достигает 25% общего количества фосфоглицеридов. Физико-химические свойства плазмалогенов сходны с таковыми у фосфолипидов. Основной их функцией является то, что они входят в состав мембран.

Диольные липиды

Хотя большинство липидов являются производными глицерина, в настоящее время известно, что все организмы — животные, растения или микроорганизмы — содержат, по крайней мере, в малых количествах липиды, которые являются производными диолов. В число таких диолов входят этиленгликоль, 1,2- и 1,3-пропандиолы, 1,3-, 1,4- и 2,3-бутандиолы, а также 1,5-пентандиол. Среди диольных липидов встречаются моно- и диацильные производные, являющиеся сложными эфирами различных жирных кислот, простые диэфиры, смешанные алкильные (или 1-алкенильные) и ацильные производные, диольные аналоги фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, диольный холинплазмалоген, ацилированные диольные галактозиды и диольные липоаминокислоты. Обычно содержание диольных липидов составляет только 0,5— 1,5% от концентрации глицеринсодержащих липидов. Однако некоторые морские моллюски и иглокожие содержат примерно равное количество производных этиленгликоля и глицерина, особенно в конце лета или осенью. Поскольку содержание диольных липидов в тканях этих организмов уменьшается в течение зимы и весны, высказано предположение, что они могут использоваться как энергетический резерв. Нормальная крысиная печень содержит относительно мало диолов. На ранних стадиях регенерации печени они присутствуют в значительно больших количествах. О биологической функции диольных липидов пока нет данных, если не считать упомянутой выше возможной роли этих соединений в качестве энергетического резерва у некоторых морских беспозвоночных. Предполагается также, что некоторые диолы замещают часть глицеринсодержащих липидов сходной структуры.

Липиды, не содержащие глицерина

Сфинголипиды

Большое число липидов может быть объединено в одну группу благодаря наличию в их структуре длинноцепочечного алифатического основания — **сфингозина** или **дигидросфингозина**. Такие липиды называются **сфинголипидами**. Хотя сфингозины являются наиболее распространенными среди природных сфинголипидов, встречаются также сфинголипиды, содержащие C16-, C17- и C19-сфингозины. Для двойной связи в сфингозинах характерна транс-конфигурация, а расположение заместителей у асимметрических атомов углерода C-2 или C-3 соответствует D-конфигурации. Сфингозин образует связь с жирной кислотой, но в отличие от глицеринсодержащих липидов, в данном случае карбоксильная группа жирной кислоты взаимодействует не со спиртовой, а с аминогруппой сфингозина, в результате

образуется не эфирная, а амидная связь. Сфинголипиды по модификации молекулы сфингозина делятся на сфингомиелины и гликосфинголипиды.

Сфингомиелины

Сфингомиелины в больших количествах встречаются в нервной ткани. При гидролизе сфингомиелинов образуются жирная кислота, фосфорная кислота, холин и сложный аминспирт **сфингозин**. Сфингомиелины могут рассматриваться как фосфохолиновые производные церамидов и являются одной из наиболее важных групп фосфолипидов. Сфингомиелины являются амфифилами как и фосфолипиды. Температура плавления определяется структурой жирных кислот, входящих в состав сфингомиелинов. Впервые сфингомиелины были обнаружены в нервной ткани, однако они входят в состав липидов крови, а также встречаются во многих других тканях. Кроме обычных сфингозинов, рассмотренных выше, сфингомиелин из мозга содержит полиненасыщенные сфингозины, называемые дегидросфингозинами. Сфингомиелины являются основными липидами, входящими в мембраны швановских клеток, которые образуют многослойную миелиновую оболочку, которая обеспечивает изоляцию нервных волокон, миелиновая оболочка позволяет увеличить скорость проведения сигнала.

Гликолипиды

Гликолипиды широко представлены в тканях, особенно в нервной ткани, в

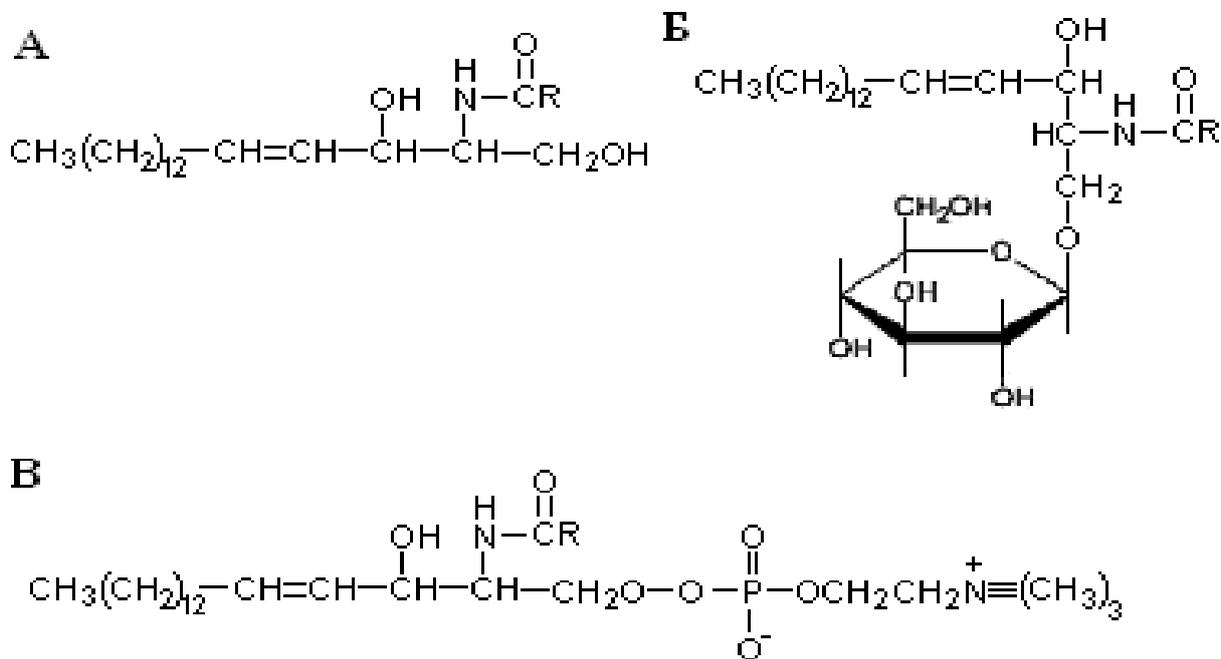


Рисунок 31: Структура сфинголипидов. А - сфингозин; Б - глюкозереброзид; В - сфингомиелин

частности в ткани мозга. Они локализованы преимущественно на наружной поверхности плазматической мембраны, где их углеводные компоненты входят в число других углеводов клеточной поверхности. Главной формой

гликолипидов в животных тканях являются гликофинголипиды. Они содержат церамид, а также один или несколько остатков сахаров. Гликофинголипиды накапливаются в аномально больших количествах при некоторых заболеваниях, связанных с нарушениями липидного обмена. Гликофинголипиды подразделяются на три основных класса: цереброзиды, церамидолигосахариды и ганглиозиды.

Цереброзиды Двумя простейшими соединениями этой группы являются галактозилцерамид и глюкозилцерамид. Галактозилцерамид—главный гликофинголипид мозга и других нервных тканей, но в небольших количествах он встречается и во многих других тканях. В его состав обычно входят различные C₁₄-жирные кислоты. Галактозилцерамид может превращаться в сульфогалактозилцерамид (классический сульфатид), который в больших количествах содержится в миелине. Простые гликофинголипиды в тканях, отличных от нервной, представлены главным образом глюкозилцерамидом; в небольших количествах он имеется и в ткани мозга.

Церамидолигосахариды. В состав молекул сфинголипидов этой группы входят гетероолигосахариды, связанные гликозидной связью с церамидом. Для обозначения этих соединений используются названия церамиддисахарид, церамидтрисахарид и т. д. Более сложными гликофинголипидами являются ганглиозиды, образующиеся из глюкозилцерамида.

Ганглиозиды. Эти сфинголипиды являются церамидолигосахаридами, содержащими помимо других сахаров, по крайней мере, один остаток сиаловой кислоты. Все ганглиозиды благодаря наличию карбоксильной группы в остатке N-ацетилнейраминовой кислоты являются кислыми соединениями. Как следует из названия этих соединений, ганглиозиды были впервые выделены из серого вещества мозга, однако они широко распространены и в других тканях. В тканях человека доминирующей сиаловой кислотой является нейраминовая кислота (NeuAc). Ганглиозиды в больших количествах находятся в нервной ткани. Они, по-видимому, выполняют рецепторные и другие функции. Простейшим ганглиозидом, встречающимся в тканях, является G_{M3}; он содержит церамид, одну молекулу глюкозы, одну молекулу галактозы и одну молекулу NeuAc. В данном - сокращении G означает ганглиозид (ganglioside), M—моносиаловое соединение (содержащее одну молекулу сиаловой кислоты), а индекс 3—условный номер, присвоенный на основе положения при хроматографическом разделении. G_{M1} представляет значительный биологический интерес, поскольку известно, что в эпителии кишечника человека он является рецептором холерного токсина. Другие ганглиозиды содержат от одной до пяти молекул сиаловой кислоты: их называют ди-, трисиалоганглиозиды и т.д.

Гликолипиды являются амфифилами, причем большими, чем сфингомиелины, так как содержат углеводный компонент. Температура плавления также определяется структурой жирной кислоты.

Функции гликолипидов

Все гликолипиды входят в состав мембран прежде всего цитоплазматической. Расположение их в мембране таково, что углеводный компонент направлен в окружающую среду, формируя гликокалекс. Гликокалекс образует поверхность уникальную для каждого вида клеток, выполняя сигнальную и рецепторную функцию.

Церамиддисахарид, называемый лактозилцерамидом или цитолипином Н, при определенных условиях обладает иммунологической активностью.

Впервые ганглиозиды были обнаружены в ганглиях, откуда и произошло их название. Наиболее богат ганглиозидами мозг, особенно его серое вещество. Позднее они были обнаружены и в других тканях (почка, селезенка, печень, легкие и т. д.). Несмотря на многочисленные исследования, биологическое значение ганглиозидов до настоящего времени установлено далеко не полностью. Однако известно, что ганглиозиды локализуются преимущественно в плазматических мембранах и, видимо, в значительной степени определяют контактное торможение, адгезию и электрофоретическую подвижность клеток. Исследованиями, проведенными в последние годы, показано, что ганглиозиды специфично связывают токсины ботулизма, столбняка, холеры, дифтерийной палочки, а также стрихнин, бруцин, тебаин, вероятно, серотонин и, возможно, играют определенную роль в их рецепции.

Воска

Общее название **воска** относится к сложным эфирам длинноцепочечных насыщенных или ненасыщенных жирных кислот (с числом углеродных атомов от 14 до 36) и длинноцепочечных спиртов (с числом углеродных атомов от 16 до 22). Так, спермацет, получаемый из головного масла кашалотов, состоит главным образом из цетилпальмитата, а пчелиный воск очень богат мирицилпальмитатом.

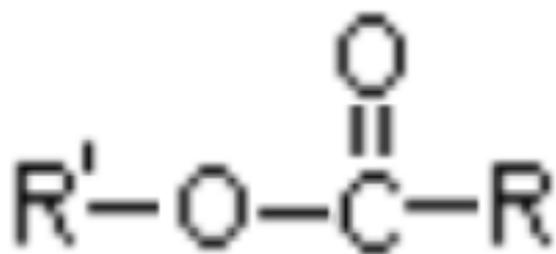


Рисунок 32: Структурная формула восков. R - радикал жирной кислоты; R' - радикал высшего спирта

Воска являются гидрофобными соединениями также, как и триацилглицеролы. Температура их плавления зависит не только от структуры жирной кислоты, входящей в

состав воска, но и от структуры высшего спирта. Чем больше длина его углеводородного радикала, тем выше температура плавления. Двойные связи в составе радикала уменьшают температуру плавления.

Функции восков

У позвоночных секретиремые кожными железами воска выполняют функцию защитного покрытия, смазывающего и смягчающего кожу и предохраняющего ее от воды. Восковым секретом покрыты также волосы, шерсть и мех. У птиц,

особенно водоплавающих, выделяемые копчиковой железой воска придают перьевому покрову водоотталкивающие свойства.

Листья многих растений покрыты защитным слоем воска. Блеск листьев многих тропических растений, а также падуба, рододендронов и сумаха обусловлен отражением света от воскового покрытия.

Воска вырабатываются и используются в очень больших количествах морскими организмами, особенно планктонными, у которых они служат основной формой накопления высококалорийного клеточного топлива. Поскольку киты, сельди, лососевые и многие другие виды морских животных питаются главным образом планктоном, содержащиеся в нем воска играют важную роль в морских пищевых цепях в качестве основного источника липидов.

Терпены

В живой природе существует множество соединений, структура углеродного скелета которых сходна с изопреном (2-метилбутан-диеном). У многих из этих соединений число углеродных атомов кратно пяти, так что структуру каждого из них можно разбить на ряд фрагментов, сходных с изопреном. Соединения этого класса называются терпенами [*turpentine (англ.)* — скипидар]. В зависимости от количества изопреновых звеньев терпены делятся на дитерпеноиды и политерпеноиды. В зависимости от наличия циклов на линейные и содержащие цикл.

Функции терпенов

Функции терпеноидов очень многообразны.

Эфирные масла, такие, как цитраль, пинен, гераниол, камфора являются дитерпеноидами.

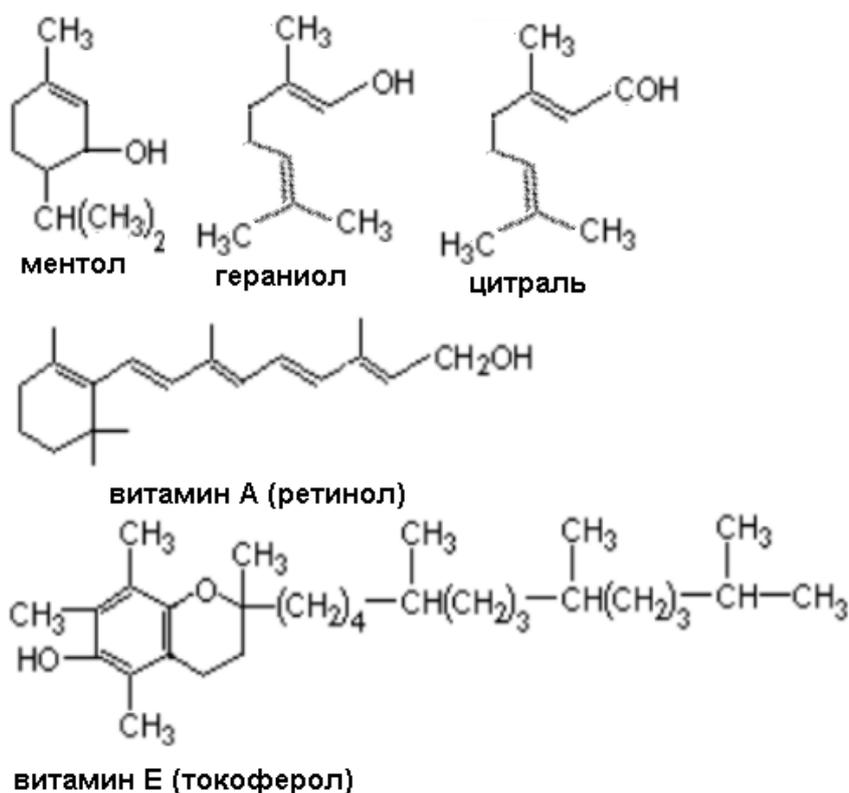
К линейным политерпеноидам растений относятся Смоляные кислоты и каучук и другие составляющие млечного сока и смол, также к ним относится фитол — который встраиваясь в мембрану хлоропласта закрепляет в ней хлорофилл.

К растительным терпеноидам растений прежде всего относятся каротиноиды дополнительные пигменты фотосинтеза высших растений.

Животные синтезируют дитерпеноиды. У насекомых линейные политерпеноиды являются гормонами. Политерпеноиды, содержащие цикл, у млекопитающих являются витаминами. К ним относятся **убихинон (или витамин Q)** — компонент дыхательной цепи митохондрий Антигеморрагический фактор — **витамин K**, а также кофермент Q, функционирующий как переносчик электронов. Существует несколько природных токоферолов. **Витамин E** выполняет, по крайней мере, две метаболические функции. Во-первых, он служит наиболее сильнодействующим природным жирорастворимым антиоксидантом и, во-вторых, выполняет специфическую, хотя и не до конца понятную, роль в метаболизме селена. Витамин A участвует в окислительно-восстановительных процессах, регуляции синтеза белков, способствует нормальному обмену веществ,

функции клеточных и субклеточных мембран, играет важную роль в формировании костей и зубов, а также жировых отложений; необходим для роста новых клеток, замедляет процесс старения.

Издавна известно благотворное влияние витамина А на зрение: еще в древности



вареная печень - один из основных источников витамина А - использовалась как средство от ночной слепоты. Он имеет огромное значение для фоторецепции, обеспечивает нормальную деятельность зрительного анализатора, участвует в синтезе зрительного пигмента сетчатки и восприятию глазом света.

Витамин А необходим для нормального функционирования иммунной системы и является неотъемлемой частью процесса борьбы с инфекцией. Применение ретинола повышает

Рисунок 33: Структурные формулы различных терпеноидов

барьерную функцию слизистых оболочек, увеличивает фагоцитарную активность лейкоцитов и других факторов неспецифического иммунитета. Витамин А защищает от простуд, гриппа и инфекций дыхательных путей, пищеварительного тракта, мочевых путей. Наличие в крови витамина А является одним из главных факторов, ответственных за то, что дети в более развитых странах гораздо легче переносят такие инфекционные заболевания как корь, ветряная оспа, тогда как в странах с низким уровнем жизни намного выше смертность от этих 'безобидных' вирусных инфекций. Обеспеченность витамином А продлевает жизнь даже больным СПИДом.

Ретинол необходим для поддержания и восстановления эпителиальных тканей, из которых состоят кожа и слизистые покровы. Не зря практически во всех современных косметических средствах содержатся ретиноиды - его синтетические аналоги. Действительно, витамин А применяется при лечении практически всех заболеваний кожи (акне, прыщи, псориаз и т.д.). При повреждениях кожи (раны, солнечные ожоги) витамин А ускоряет процессы заживления, а также стимулирует синтез коллагена, улучшает качество вновь образующейся ткани и снижает опасность инфекций.

Ввиду своей тесной связи со слизистыми оболочками и эпителиальными клетками витамин А благотворно влияет на функционирование легких, а также

является стоящим дополнением при лечении некоторых болезней желудочно-кишечного тракта (язвы, колиты).

Ретинол необходим для нормального эмбрионального развития, питания зародыша и уменьшения риска таких осложнений беременности, как малый вес новорожденного.

Витамин А принимает участие в синтезе стероидных гормонов (включая прогестерон), сперматогенезе, является антагонистом тироксина - гормона щитовидной железы.

Как витамин А, так и в-каротин, будучи мощными антиоксидантами, являются средствами профилактики и лечения раковых заболеваний, в частности, препятствуя повторному появлению опухоли после операций.

'И витамин А, и в-каротин защищают мембраны клеток мозга от разрушительного действия свободных радикалов, при этом в-каротин нейтрализует самые опасные виды свободных радикалов: радикалы полиненасыщенных кислот и радикалы кислорода.'

Антиоксидантное действие в-каротина играет важную роль в предотвращении заболеваний сердца и артерий, он обладает защитным действием у больных стенокардией, а также повышает содержание в крови 'полезного' холестерина (ЛПВП).

Лютеин и зеаксентин - главные каротиноиды, защищающие наши глаза: они способствуют предупреждению катаракты, а также снижают риск дегенерации желтого пятна (важнейшего органа зрения), которая в каждом третьем случае является причиной слепоты.

Еще один каротиноид - ликопин (содержится в основном в помидорах) защищает от атеросклероза, предотвращая окисление и накопление на стенках артерий холестерина низкой плотности. Кроме того, это самый 'сильный' каротиноид в отношении защиты от рака, особенно рака молочной железы, эндометрия и простаты.

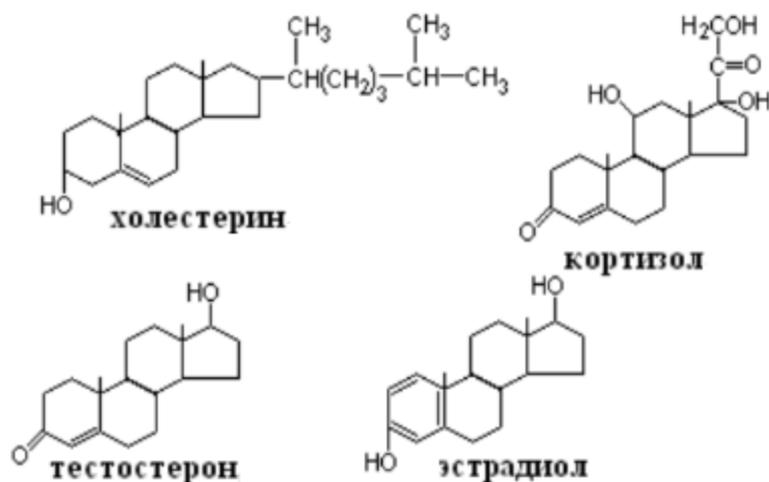
Стероиды

Стероиды часто обнаруживаются в ассоциации с жирами. Их можно отделить от жира путем омыления (они попадают в «неомыляемую» фракцию). Наиболее широко распространенными стероидами являются стеролы, т.е. стероидные спирты. Остальная часть молекулы, относительно жестка и гидрофобна. Все стероиды содержат однотипное циклическое ядро, сходное с молекулой фенантрена (кольца А, В и С), с которым соединено циклопентановое кольцо (D). Стероиды резко гидрофобны и не растворимы в гидрофильных растворителях и в воде.

Холестерол является одним из главных компонентов плазматической мембраны и липопротеинов плазмы; часто находится в форме эфиров жирных кислот и служит исходным соединением для синтеза всех стероидов, функционирующих в организме. Холестерол находится в животных, но не в растительных жирах.

Холестерол синтезируется в организме человека, но он не окисляется до углекислого газа и воды.

Эргостерол содержится в растениях и дрожжах, входя в состав мембран растительных клеток, он важен тем, что является предшественником витамина



Д. После облучения ультрафиолетовым светом он приобретает противорахитное действие (при раскрытии кольца В), эргостерина, который, как и ряд других растительных стероидов, имеет 8 углеродных атомов и одну двойную связь в боковой цепи. Ультрафиолетовое облучение обоих этих соединений вызывает разрыв кольца В, что приводит к образованию продуктов, обладающих

Рисунок 34: Структурные формулы стероидов

активностью витамина D.

Другое производное холестерина — желчные кислоты, обеспечивающие эмульгацию жиров при их переваривании. Также с желчными кислотами конъюгируют чужеродные вещества для их из организма.

Также к стероидам относятся гормоны млекопитающих. Андрогены, или мужские половые гормоны. Примером может служить тестостерон, синтезируемый в семенниках. Эстрогены — женские половые гормоны. Эстроген, секретируемый яичниками, представляет собой эстрадиол. Также к стероидым относятся гормоны коры надпочечников: глюкокортикоиды (основной кортизол) участвующие в регуляции энергетического обмена и концентрации глюкозы в крови при длительном стрессе, и минералокортикоиды (основной альдостерон), регулирующие концентрацию ионов в организме, альдостерон контролирует концентрацию Na^+ стимулируя его реабсорбцию в почечных канальцах.

Липопротеины

Ряд липидов образует комплексы со специфическими белками; эти комплексы называют липопротеинами. В плазме крови имеются три основных класса липопротеинов плазмы, причем содержание липидов в них может составлять от 50 до 90%. Молекулы липидов и полипептидов в липопротеинах прочно связаны друг с другом, хотя и не образуют ковалентных серол и его эфиры. Неполярные триацилглицеролы и эфиры холестеролвязей. Липопротеины плазмы содержат полярные липиды и триацилглицеролы, а также холесте спрятаны внутри под оболочкой, образованной водорастворимыми, гидрофильными участками полипептидных цепей и полярными головами молекул фосфоглицеридов. Наличие внешней гидрофильной оболочки в липопротеидах делает эти богатые липидами структуры растворимыми в воде и

хорошо приспособленными для транспорта липидов из тонкого кишечника в жировые депо и в различные ткани. Классификация липопротеидов плазмы крови основана на величине их плотности, которая в свою очередь зависит от содержания липидов. Чем выше содержание липидов, тем ниже плотность липопротеидов и тем больше скорость, с которой они движутся вверх, т.е. всплывают, во время центрифугирования плазмы крови при очень высоких скоростях вращения ротора. Кроме липопротеидов трех классов, в плазме крови содержатся также хиломикроны (особенно после приема жирной пищи). Хиломикроны представляют собой капельки, состоящие практически из чистых триацилглицеролов, окруженных очень тонким слоем белков. По размеру они значительно больше липопротеидов. Хиломикроны переносят триацилглицеролы из тонкого кишечника, где они всасываются во время пищеварения, в жировые депо. Многочисленные факты позволяют предположить, что высокое содержание в плазме липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) при низком содержании липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) является важным фактором возникновения атеросклероза - заболевания, протекающего с образованием обильных отложений холестерина и его эфиров.

Мембраны

Термин «мембрана» используется вот уже более 100 лет для обозначения клеточной границы, служащей, с одной стороны, барьером между содержимым клетки и внешней средой, а с другой — полупроницаемой перегородкой, через

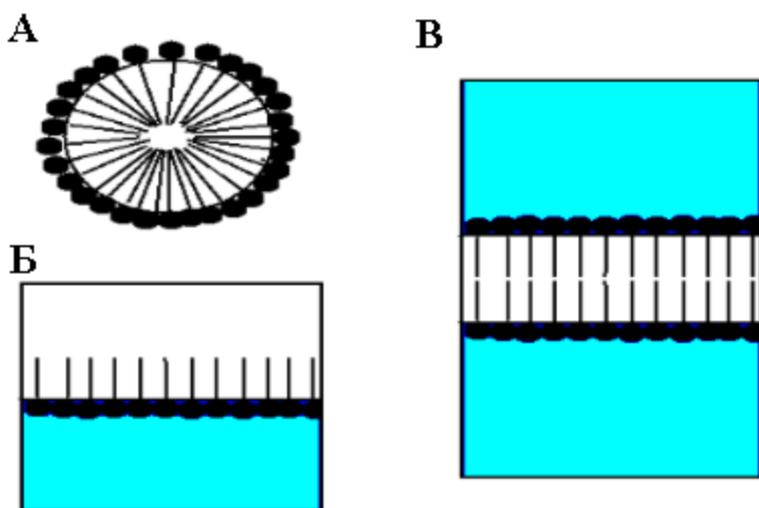


Рисунок 35: Структура А - мицеллы, Б - монослоя, В - бислоя. Голубым обозначена водная среда, белый фон гидрофобная

которую могут проходить вода и некоторые из растворенных в ней веществ. В 1851 г. немецкий физиолог Х. фон Мол описал плазмолиз клеток растений, предположив, что клеточные стенки функционируют как мембраны. В 1855 г. ботаник К. фон Негели наблюдал различия в проникновении пигментов в поврежденные и неповрежденные растительные клетки и исследовал клеточную границу, которой он дал название **плазматическая мембрана**. Он предположил, что клеточная граница ответственна за осмотические свойства клеток. В 1877 г. немецкий ботаник В. Пфедфер опубликовал свой труд «Исследование осмоса», где постулировал существование клеточных мембран, основываясь на сходстве между клетками и осмометрами, имеющими искусственные полупроницаемые мембраны. В 80-х

которую могут проходить вода и некоторые из растворенных в ней веществ. В 1851 г. немецкий физиолог Х. фон Мол описал плазмолиз клеток растений, предположив, что клеточные стенки функционируют как мембраны. В 1855 г. ботаник К. фон Негели наблюдал различия в проникновении пигментов в поврежденные и неповрежденные растительные клетки и исследовал клеточную границу, которой он дал название **плазматическая мембрана**.

годах прошлого столетия датский ботаник Х. де Фриз продолжил осмометрические исследования растительных клеток, предположив, что неповрежденный слой протоплазмы между плазмалеммой и тонопластом функционирует как мембрана. Его исследования послужили фундаментом при создании физико-химических теорий осмотического давления и электролитической диссоциации голландцем Я. Вант-Гоффом и шведским ученым С. Аррениусом. В 1890 г. немецкий физикохимик и философ В. Оствальд обратил внимание на возможную роль мембран в биоэлектрических процессах. Между 1895 и 1902 годами Э. Овертон измерил проницаемость клеточной мембраны для большого числа соединений и наглядно показал зависимость между растворимостью этих соединений в липидах и способностью их проникать через мембраны. Он предположил, что мембрана имеет липидную природу и содержит холестерин и другие липиды. Современные представления о строении мембран как подвижных липопротеиновых ансамблей были сформулированы в начале 70-х годов нашего столетия. Быстрое развитие биоорганической химии мембран и, прежде всего, широкое исследование структуры мембранных белков и липидов во многом обусловили прогресс в познании важнейших функций биомембран, таких, как транспорт различных метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного возбуждения, рецепция сигналов внешней среды и т. п.

Как и мыла, полярные липиды обладают амфипатическими свойствами. При взбалтывании в воде или водных растворах полярные липиды спонтанно формируют **мицеллы**, в которых углеводородные хвосты липидов спрятаны от воды, а электрически заряженные гидрофильные головы располагаются на поверхности частицы, взаимодействуя с водным окружением. Такие мицеллы могут состоять из тысяч липидных молекул. Полярные липиды способны также растекаться по поверхности водных растворов, образуя слой толщиной в одну молекулу - **монослой**. В таких системах углеводородные хвосты обращены к воздушной среде и избегают, таким образом, контакта с водой, а гидрофильные головы погружены в полярную водную фазу. На поверхности раздела двух водных фаз полярные липиды легко и самопроизвольно формируют очень тонкие **бислои**. В таких структурах углеводородные хвосты липидных молекул направлены внутрь от обращенных к каждой из фаз поверхностей и образуют внутренний непрерывный углеводородный слой, а располагающиеся снаружи гидрофильные головы оказываются погруженными в водный раствор. В зависимости от природы содержащихся в них жирных кислот фосфолипидные бислои имеют толщину от 6 до 7 нм, они лишены жесткости, находятся в жидком состоянии и легко могут изгибаться. В лабораторных условиях такие бислои нетрудно получить путем сильного встряхивания водных суспензий фосфолипидов; при этом образуются **липосомы** - замкнутые пузырьки, окруженные непрерывным бислоем. Фосфолипидные бислои можно получить также на маленьких отверстиях перегородок, разделяющих два водных раствора. Липидные бислои и липосомы служат предметом интенсивных исследований, так как оказалось, что по своим свойствам они очень сходны с

природными мембранами. Например, и полярные липидные бислои, и природные мембраны обладают высоким электрическим сопротивлением, вследствие чего и те и другие непроницаемы для катионов или анионов, но легко пропускают молекулы воды.

Еще одно важное свойство липидного бислоя - это *кооперативность его структуры*. Цельность бислоя обеспечивается множеством **усиливающих друг друга нековалентных взаимодействий**. Фосфолипиды и гликолипиды образуют в воде конгломераты (кластеры), в которых контакт углеводородных цепей с водой сведен до минимума. Эту ситуацию можно сравнить с овцами, сбившимися в тесную кучу в холодную погоду, чтобы снизить потерю тепла. Образованию кластеров способствуют также ван-дер-ваальсовы взаимодействия между соседними углеводородными цепями. Все эти взаимодействия обеспечивают связи между молекулами называются **гидрофобными связями**. Эти энергетические факторы приводят к трем биологически важным последствиям: 1) липидные бислои имеют тенденцию к **увеличению своей поверхности**; 2) липидные бислои стремятся **замкнуться** на себя так, чтобы на концах не оставалось доступных для контакта с водой углеводородных цепей; в результате замыкания возникает ограниченное пространство (компармент); 3) липидные слои способны **самозапечатываться** (самосшиваться), поскольку любая дырка в бислое энергетически невыгодна.

Общие свойства биологических мембран

Мембраны различаются как по функции, так и по структуре. Однако всем им присущи следующие основные свойства.

1. Мембраны представляют собой плоскую структуру толщиной в несколько молекул, образующую сплошную перегородку между отдельными отсеками (компарментами). Толщина мембран составляет обычно 60 — 100Å.
2. Мембраны состоят главным образом из липидов и белков. Весовое соотношение белков и липидов для большинства биологических мембран лежит в пределах от 1:4 до 4:1. В мембранах имеются также углеводные компоненты, связанные с липидами и белками,
3. Липиды мембран представлены относительно небольшими молекулами, несущими гидрофильные и гидрофобные группы. В водной среде эти липиды спонтанно образуют замкнутые бимолекулярные слои. Такие липидные двойные слои (бислои) служат барьером для полярных соединений.
4. Отдельные функции мембран опосредуются специфическими белками. Белки выполняют роль насосов, каналов, рецепторов, ферментов и преобразователей энергии. Белки мембран встроены (интеркалированы) в липидный бислой, что создает пригодную для проявления их активности среду.
5. Мембраны - нековалентные надмолекулярные структуры; составляющие мембрану белки и липиды удерживаются вместе благодаря возникновению множества нековалентных взаимодействий, кооперативных по своему характеру.
6. Мембраны асимметричны: их наружная и внутренняя поверхности отличаются друг от друга.

7. Мембраны - жидкие структуры. Если молекулы липидов, так же как и белков, не зафиксированы в определенном месте силами специфического взаимодействия, то они легко диффундируют в плоскости мембраны.

Состав мембраны

Мембраны можно рассматривать как двумерные растворы определенным образом ориентированных белков и липидов.

Во всех мембранах имеются полярные липиды в количестве, составляющем в зависимости от типа мембраны от 20 до 80% ее массы, остальное приходится главным образом на долю белков. Так, в плазматических мембранах животных клеток количество белков и липидов, как правило, примерно одинаково; во внутренней митохондриальной мембране содержится около 80% белков и только 20% липидов, а в миелиновых мембранах мозга, наоборот, около 80% липидов и только 20% белков. Липидная часть мембран представляет собой смесь различного рода полярных или амфипатических липидов. В мембранах животных клеток присутствуют в основном фосфоглицериды и в меньших количествах сфинголипиды. Триацилглицеролы обнаруживаются лишь в следовых количествах. К числу важных липидных компонентов многих мембран относится и *холестерол*. Он присутствует у эукариот, и его нет у большинства прокариот. Как правило, холестерином богаты плазматические мембраны клеток эукариот, тогда как мембраны клеточных органелл содержат относительно мало этого нейтрального липида. В клеточных мембранах эукариот содержится от 2 до 10% углеводов в форме *гликолипидов* и *гликопротеинов*. Как было сказано выше, гликолипиды высших организмов представлены производными сфингозина с одним или более остатками сахара. В мембранных гликопротеинах одна или несколько углеводных цепей присоединены к боковым цепям серина, треонина или аспарагина (обычно через N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин). Возможно, что углеводные группы служат для ориентирования гликопротеинов в мембране. Обладая ярко выраженными гидрофильными свойствами, остатки сахаров в гликопротеинах или гликолипидах должны располагаться на поверхности мембраны, а не в ее углеводородной сердцевине. Энергетическая цена встраивания олигосахаридной цепи в углеводородное окружение внутри мембраны очень высока. Стало быть, существует барьер, препятствующий свободному вращению гликопротеина от одной стороны мембраны к другой. Углеводные компоненты мембранных гликопротеинов способствуют поддержанию асимметрии биологических мембран. Для каждого типа мембран любой животной клетки характерен свой относительно постоянный липидный состав. В различных мембранах на долю белков приходится от 20 до 80% массы. В мембране эритроцита, например, содержится около 20 различных белков, а во внутренней митохондриальной мембране их значительно больше. Некоторые белки в мембранах обладают ферментативной активностью, другие обеспечивают связывание и перенос молекул полярных веществ через мембраны. Мембранные белки различаются по характеру связи с мембранными структурами. Одни белки, называемые **внешними**, или **периферическими**,

непрочно связаны с поверхностью мембраны; другие, называемые **внутренними**, или **интегральными**, погружены внутрь мембраны и даже могут пронизывать ее насквозь. Периферические белки обычно легко экстрагируются из мембран, тогда как интегральные белки могут быть выделены только при помощи детергентов или органических растворителей.

Строение мембраны

В 1972 г. Джонатан Сингер и Гарт Николсон предложили жидкостно-

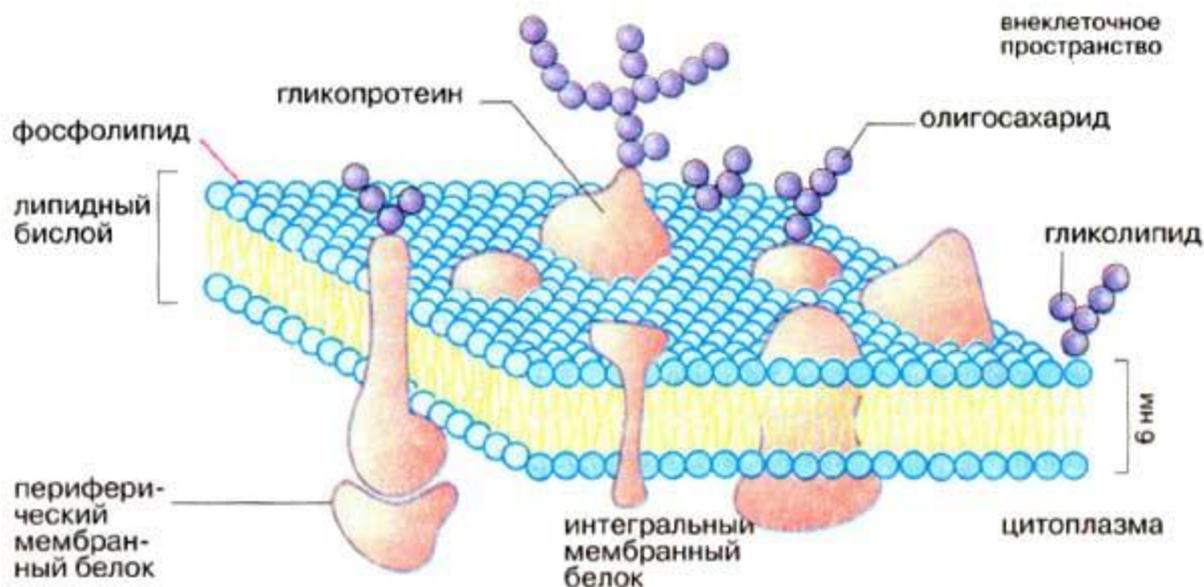


Рисунок 36: Схема мембраны

мозаичную модель, объясняющую в общих чертах организацию биологических мембран. Согласно этой модели, мембраны представляют собой **двумерные растворы определенным образом ориентированных глобулярных белков и липидов**. В пользу предложенной модели свидетельствует большое количество экспериментальных данных. Основные положения жидкостно-мозаичной модели сводятся к следующему.

1. Большая часть мембранных фосфолипидов и гликолипидов представлена в виде бислоя. Липидный бислой играет двойную роль, будучи одновременно растворителем для интегральных белков мембраны и барьером проницаемости.
2. Небольшая часть мембранных липидов специфически связана с определенными мембранными белками и, вероятно, необходима для их функционирования.
3. Мембранные белки свободно диффундируют в липидном матриксе в латеральном направлении, но не могут перемещаться в поперечном направлении, т. е. от одной поверхности мембраны к другой.

Природные мембраны характеризуются очень малой толщиной (от 6 до 9 нм), эластичностью, а также тем, что они находятся в жидком состоянии. Через мембраны легко проходит вода, но они практически полностью непроницаемы для заряженных ионов типа Na^+ , Cl^- или H^+ и для полярных, но не заряженных молекул, например сахаров.

Гликокаликс — это «пушистая оболочка» состоит из гидрофильных олигосахаридных групп гликопротеинов и гликолипидов, ее толщина - около 100 нм, что приблизительно в 10 раз превышает толщину липидного бислоя.

Мембраны — жидкие кристаллы

Биологические мембраны - это не застывшие структуры. Напротив, и липиды, и многие белки мембран постоянно перемещаются в латеральном направлении. Быстрое движение белков мембраны выявляется с помощью флуоресцентной микроскопии при следующей постановке опыта. Культивируемые клетки человека и клетки мыши можно заставить слиться друг с другом; образующаяся при этом гибридная клетка называется **гетерокарион**. Одна часть плазматической мембраны гетерокариона происходит из клетки мыши, а другая - из клетки человека. Остаются ли мембранные белки мыши и человека разделенными в гетерокарионе или они смешиваются? Для ответа на этот вопрос использовали маркеры, а именно антитела с флуоресцентной меткой и далее визуально наблюдали за ними с помощью светового микроскопа. Антитело к мембранным белкам мыши имело зеленую флуоресценцию, а антитело к мембранным белкам человека - красную. В новообразованном гетерокарионе одна половина поверхности светилась зеленым, а другая - красным. Однако меньше чем через час (при 37°C) участки зеленой и красной флуоресценции полностью смешивались. Этот опыт показывает, что мембранный белок способен диффундировать на расстояние порядка нескольких микрон примерно за 1 мин. Экспериментально установленная величина коэффициента диффузии показывает, что вязкость мембран примерно в 100 раз выше вязкости воды и близка к вязкости оливкового масла.

В отличие от липидов белки очень неоднородны в отношении латеральной подвижности. **Некоторые белки почти так же подвижны, как липиды, другие - практически неподвижны.** В отличие от движения в плоскости мембраны спонтанное перемещение липидов от одной поверхности мембраны к другой происходит очень медленно. Перемещение молекул с одной поверхности мембраны на другую называют **поперечной диффузией** (или "flip-flop"-перескок), тогда как диффузию молекул в плоскости мембраны называют **латеральной диффузией**. Методом электронного парамагнитного резонанса было проведено прямое определение поперечной диффузии фосфолипидных молекул в фосфатидилхолиновых пузырьках; оказалось, что **переход молекулы фосфолипида с одной стороны бислоя на другую совершается один раз за несколько часов**. Таким образом, поперечная диффузия молекулы фосфолипида на расстояние 50 Å занимает в 10^9 раз больше времени, чем диффузия на то же расстояние в латеральном направлении.

Энергетический барьер для поперечной диффузии молекул белка еще выше, чем для липидов, поскольку в белках значительно больше полярных участков. Проведенные исследования не выявили поперечной диффузии белка. Следовательно, асимметрия мембран сохраняется на довольно длительное время.

Мембрана должна обладать определенной текучестью, но изменение температуры окружающей может ее изменять, это связано с температурой

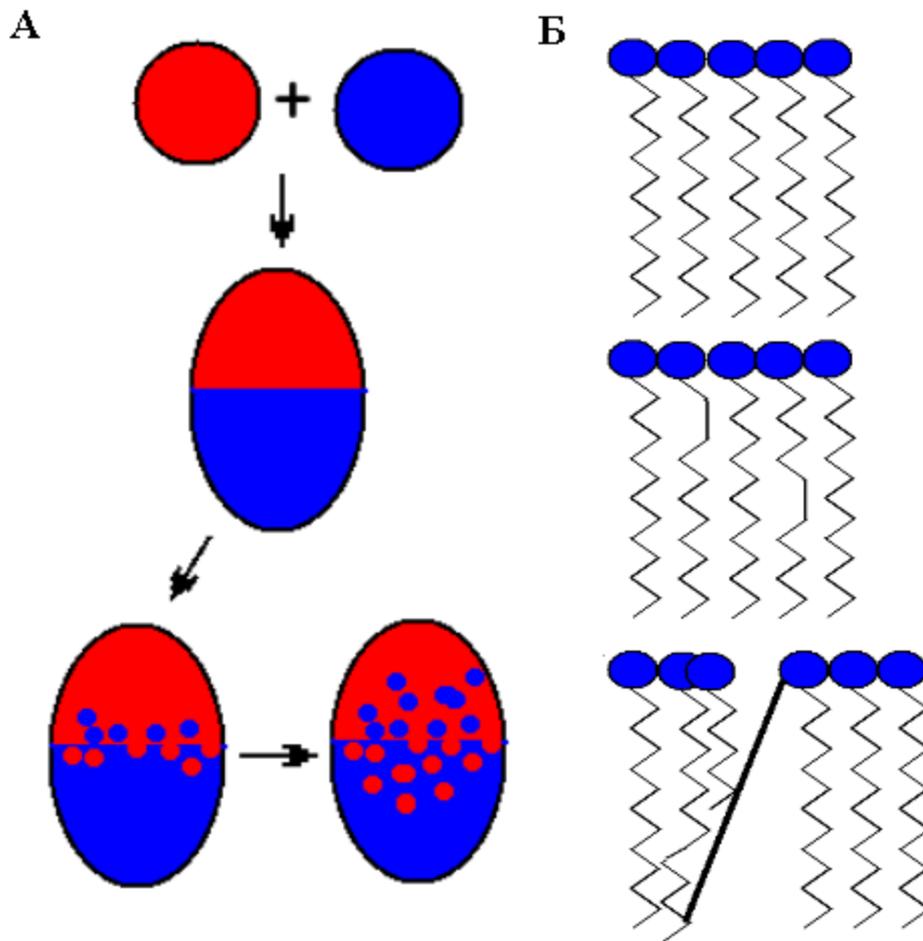


Рисунок 37: Доказательства жидко-кристалличности мембраны. А - схема доказательства, что мембрана жидкая; Б - схема упорядоченности мембраны и механизмы ее нарушающие

плавления липидов в бислое. Текучесть мембран зависит от состава жирных кислот и содержания холестерина.

В мембранном бислое цепи жирных кислот в молекулах липидов могут находиться либо в строго упорядоченном жестком, либо в относительно дезорганизованном, жидком состоянии. В упорядоченном состоянии все связи С—С имеют транс-конформацию,

тогда как в неупорядоченном - гош-конформацию. Переход от твердого

(полностью транс-) к жидкому (частично гош-) состоянию происходит при повышении температуры выше точки плавления $T_{пл}$. Этот температурный переход зависит от длины цепи и степени ненасыщенности ацильного остатка. Наличие насыщенных ацильных остатков благоприятствует жесткому состоянию, так как прямые углеводородные цепи легко взаимодействуют между собой. Наличие же двойной связи цис-конфигурации приводит к изгибу углеводородной цепи, из-за которого нарушается строгая упорядоченность укладки ацильных остатков, и в результате $T_{пл}$ снижается. Температура перехода из жесткого состояния в жидкое зависит также от длины цепи. Длинные углеводородные цепи образуют более прочные связи друг с другом, чем короткие. В частности, каждая дополнительная группа $—CH_2—$ изменяет свободную энергию связи двух прилежащих углеводородных цепей на $— 0,5$ ккал/моль.

Прокариоты регулируют текучесть своих мембран путем изменения числа двойных связей и длины ацильных цепей. Так, соотношение насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в мембране *E. coli* снижалось с 1,6 до 1,0 при понижении температуры среды с 42 до 27°C. Такое уменьшение доли насыщенных жирных кислот предотвращает чрезмерное затвердевание мембраны при пониженной температуре. У эукариот ключевым регулятором текучести мембран является также холестерол. Находясь между ацильным и цепями, холестерол препятствует их кристаллизации. В сущности, из-за холестерола исчезает фазовый переход. С другой стороны, холестерол стерически блокирует сильное перемещение ацильных цепей и тем самым снижает текучесть мембран. Таким образом, благодаря этим взаимопротивоположным эффектам холестерола текучесть мембран поддерживается на каком-то среднем уровне.

С другой стороны липиды и белки являются кристаллами. Степень кристалличности определяется упорядоченностью структуры. Максимально упорядочены хвосты насыщенных жирных кислот, взаимодействующие между собой за счет ван-дер-ваальсовых связей. Двойные связи изменяют углы связей, образуя Г-подобные структуры, нарушая упорядоченность. Холестерин «раздвигая» хвосты, также нарушает упорядоченность.

Асимметрия мембран

Мембраны асимметричны как по структуре, так и по функциям; об этом свидетельствуют примеры ориентации гликофорина и анионного канала, а также - более общий случай - локализация углеводов на наружной поверхности мембран. Наружная и внутренняя поверхности всех известных биологических мембран различаются по составу и ферментативной активности. Асимметрия затрагивает как липидный так и белковый компоненты мембраны. Особенно это характерно для плазматической мембраны.

В липидном компоненте гликолипиды преобладают в той части бислоя, которая обращена во внешнюю среду, фосфолипиды преобладают в цитоплазматической части бислоя.

Интегральные белки четко ориентированы в бислое, таким образом чтобы выполнять свои функции поэтому домены разных слоев бислоя не совпадают.

Например, Na^+ - K^+ -насос ориентирован в плазматической мембране таким образом, что выводит Na^+ из клетки и насасывает K^+ в клетку. Гликопротеиды также ориентированы так чтобы углеводный компонент располагался во внешней среде. Периферические белки также в основном ассоциированы с цитоплазматической частью мембраны.

Функции мембраны

Барьерная. Липидные бислои ограничивают как клетку, так и отдельные ее компартменты, являясь барьером для большинства веществ.

Транспортная. Плазматическая мембрана, так же как и другие липопротеидные мембраны клетки, является полупроницаемой. Это значит, что через нее с различной скоростью проходят разные молекулы и чем больше размер молекул, тем меньше скорость прохождения их через мембрану. Это

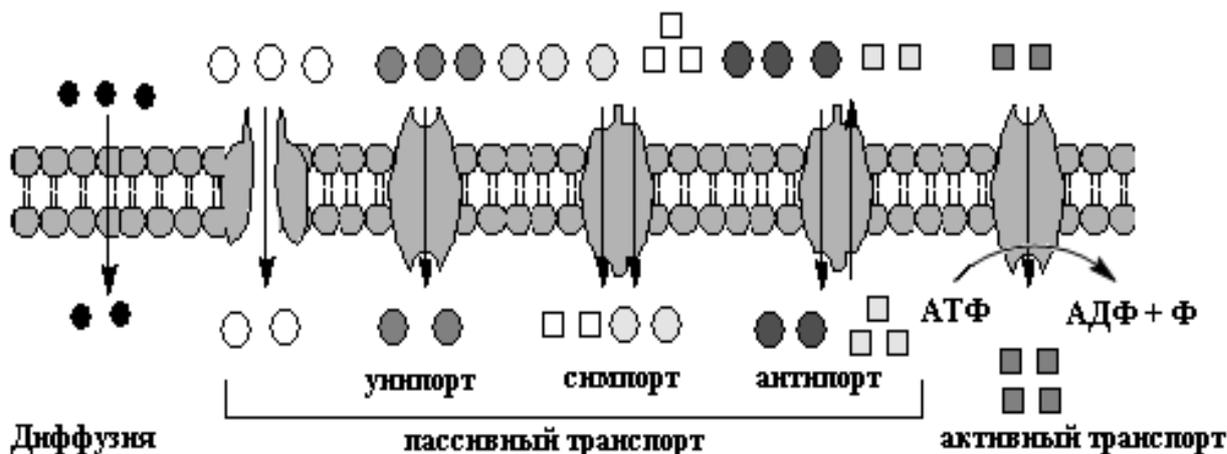


Рисунок 38: Типы транспорта через мембрану

свойство определяет плазматическую мембрану как осмотический барьер. Максимальной проникающей способностью обладают вода и растворенные в ней газы, значительно медленнее проникают сквозь мембрану ионы (примерно в 10^4 раз медленнее). Транспорт веществ через мембрану подразделяют на пассивный (простая и облегченная диффузия) идет по градиенту концентрации, без затрат энергии, и активный — против градиента концентрации с затратой энергии. Газы, вода и гидрофобные вещества транспортируются диффузией через липидный бислой — простая диффузия. Все заряженные молекулы транспортируются белками. Белки-каналы осуществляют простую диффузию (например, порины), пермеазы — облегченную, среди пермеаз выделяют унипорты (переносят один тип молекул), симпорты (две молекулы в одном направлении) и антипорты (две молекулы в противоположных направлениях) например, АДФ/АТФ — антипорт в митохондриях. Активный транспорт осуществляют «насосы», являющиеся АТФ-азами и использующие энергию гидролиза АТФ для переноса веществ против градиента концентрации. Например, Na^+ - K^+ -насос выводит Na^+ из клетки и насасывает K^+ в клетку., и Ca^{2+} -насос переносящий Ca^{2+} из цитоплазмы в гладкий ЭПС.

Сигнальная. Сигналы для распознавания другими клетками расположены на внеклеточной части мембраны, и образованы углеводным компонентом гликолипидов и гликопротеидов. Уникальная структура углеводных цепей гликолипидов и гликопротеидов формирует уникальную структуру гликокалекса. Это создает уникальную поверхность клетки, и создает набор признаков, по которым рецепторы других клеток опознают клетку. Важными компонентами многих распознающих или рецепторных участков мембраны животных клеток служат, по-видимому, ганглиозиды. Содержание

ганглиозидов по сравнению с другими мембранными липидами очень невелико, но, видимо, они могут концентрироваться в определенных участках.

Рецепторная. Распознавание внешних сигналов обеспечивается белками рецепторами. На внешней поверхности мембран имеются специфические распознающие участки, функции которых состоят в распознавании определенных молекулярных сигналов. Например, именно посредством мембраны некоторые бактерии воспринимают незначительные изменения концентрации питательного вещества, что стимулирует их движение к источнику пищи; это явление носит название хемотаксиса. На внешней поверхности мембран животных клеток есть также участки, узнающие другие клетки того же типа и тем самым способствующие связыванию клеток друг с другом в процессе формирования тканей. Распознающие участки еще одного типа служат специфическими рецепторами гормонов. Так, определенные участки на поверхности клеток печени и мышц распознают и связывают такие гормоны, как инсулин, глюкагон и адреналин. Связавшие гормон рецепторные участки передают через мембрану сигналы, которые поступают во внутриклеточные ферментативные системы и регулируют их активность.

Ферментативная. В состав мембран входит много белков ферментов (киназы, липазы, АТФ-азы и др.).

Аминокислоты и белки

Аминокислоты

Аминокислоты содержат в качестве функциональных групп аминогруппу и карбоксильную группу. В α -аминокислотах обе они связаны с одним и тем же (α) углеродным атомом. В природе существует около 300 аминокислот, однако в белках обнаружены только 20 из них. В результате полного гидролиза белков высвобождается 20 L- α -аминокислот. Одни и те же 20 аминокислот присутствуют в белковых молекулах всех форм жизни — растений, животных и микроорганизмов. Однако в ряде белков встречаются производные некоторых аминокислот, образующиеся уже после включения обычных аминокислот в молекулу белка. За исключением глицина, у которого R—это атом водорода, у всех аминокислот четыре группы, связанные с α -углеродным атомом, различны. Благодаря тетраэдрическому расположению четырех разных групп относительно α -углеродного атома аминокислота обладает оптической активностью (способностью поворачивать плоскость поляризации плоско-поляризованного света). Одни аминокислоты, входящие в состав белков, являются (при pH 7,0) правовращающими, а другие — левовращающими, однако все они имеют **абсолютную конфигурацию** L-глицеральдегида и поэтому являются L- α -аминокислотами. Треонин и изолейцин содержат по 2 хиральных центра, следовательно, существует по 4 стереоизомера каждой из этих аминокислот. В белках содержится только один из них. Оптическая стереоизомерия имеет очень большое значение для реализации механизмов биохимических процессов.

L- α -Аминокислоты — мономеры, из которых построены пептиды и белки. Лишь двадцать аминокислот — так называемые белковые аминокислоты — встраиваются в полипептидную цепь в ходе трансляции. В дальнейшем в результате реакций посттрансляционной модификации некоторые из них превращаются в другие аминокислотные остатки (например, цистеин — в цистин, серин — в фосфосерин и т.п.). В природе встречается гораздо большее число аминокислот. Например, множество "небелковых" аминокислот содержится в пептидных антибиотиках, синтез которых протекает по нематричному механизму, целый ряд "небелковых" аминокислот участвует в процессах обмена. Таковы, в частности, гомосерин, аргинин, янтарная кислота, полуальдегид аспарагиновой кислоты — промежуточные продукты биосинтеза белковых аминокислот, азетидинкарбоновая кислота - обычный компонент клеточного сока растений, таурин находится в желчи в составе конъюгатов желчных кислот, γ-Аминомасляная кислота (ГАМК) – нейромедиатор, в фибриллярном белке соединительной ткани коллагене встречаются минорные аминокислоты 4-оксипролин и 5-оксилизин, в мышечном белке миозине - N-метиллизин. Широко распространено фосфорелирование гидроксильных групп остатков серина, треонина и тирозина. Гораздо более сложное строение имеет аминокислота десмозин, входящая в состав белка эластина. Десмозин представляет собой 4 молекулы главной аминокислоты лизина, соединенные своими R-группами. В результате образуется замещенное пиридиновое кольцо (как бы четыре молекулы лизина, отходящие от одного центра). Следствием этого является образование поперечных связей между полипептидными цепями белка. Особенность десмозина - способность растягиваться в двух направлениях, что способствует эластичности соединительной ткани и т.д.

Белковые аминокислоты встраиваются в белок на рибосоме, таких аминокислот было выявлено 20 (21).

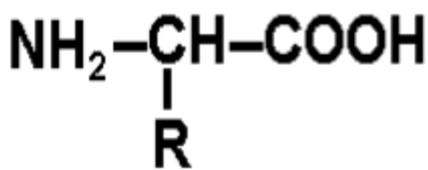


Рисунок 39: Общая формула белковых аминокислот

Небелковые аминокислоты не встраиваются на рибосоме и не кодируются в геноме, в отличие от белковых. Небелковые аминокислоты выполняют массу других функций и в состав белков могут не входить, но могут встречаться в полипептидах, но не в результате матричного синтеза на рибосоме, а после модификаций.

Все белковые аминокислоты являются L- α -аминокислотами.

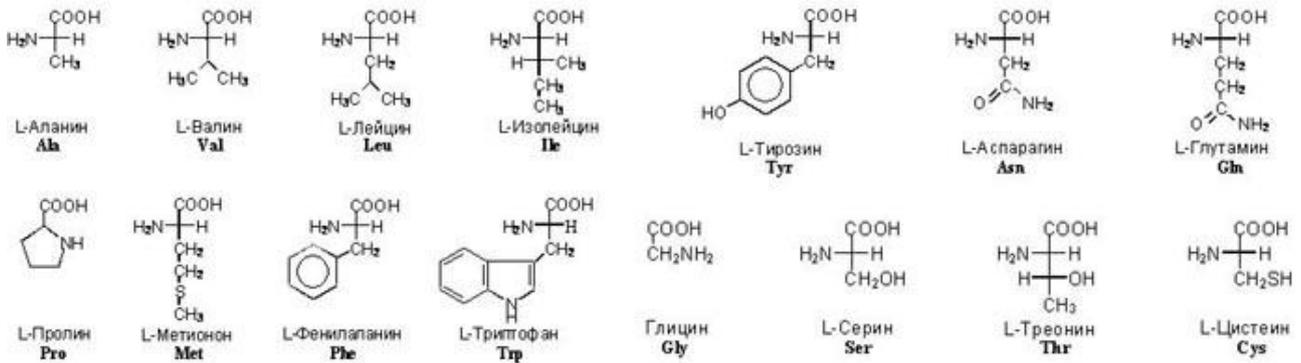
Белковые аминокислоты классифицируются по свойствам их радикалов: аминокислотные остатки с гидрофобными цепями, гидрофильные нейтральные аминокислоты, аминокислоты, содержащие ароматические радикалы, основные, кислотные боковые цепи.

Аминокислотные остатки с гидрофобными цепями различной геометрии позволяют сформировать компактное внутреннее ядро, стабилизирующее

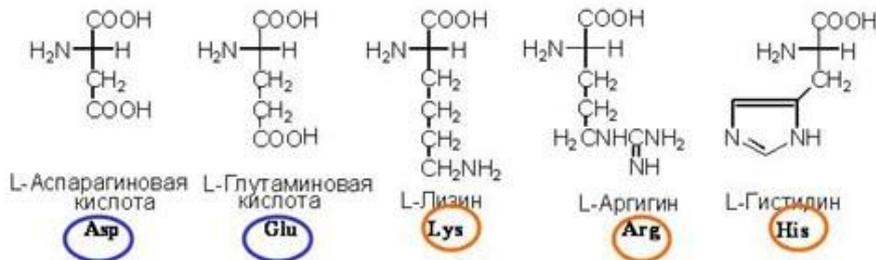
АМИНОКИСЛОТЫ

НЕПОЛЯРНЫЕ

ПОЛЯРНЫЕ НЕЗАРЯЖЕННЫЕ



ЗАРЯЖЕННЫЕ



структуру

оелка,

организовать

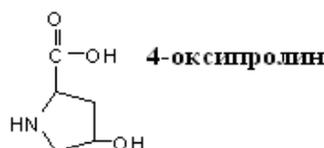
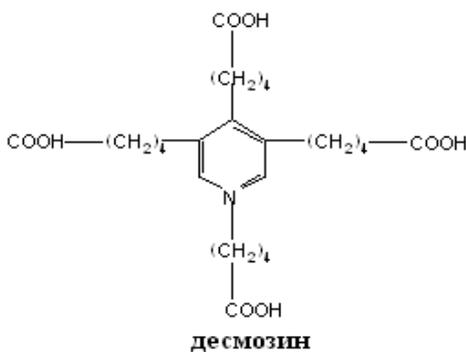
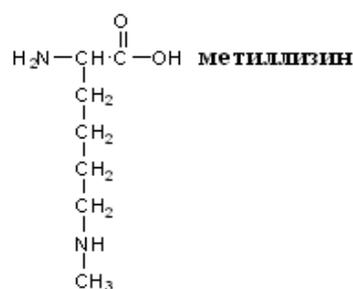
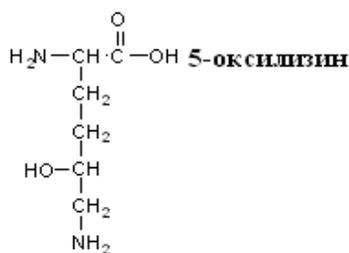
гидрофобные контакты с его лигандами. Глицин, лишенный бокового радикала, не заменим при сближении пептидных цепей, обеспечивает их повороты. Гидрофильные

нейтральные

аминокислоты — серин, треонин, аспарагин, глутамин — участвуют в образовании системы водородных связей, обеспечивают гидратацию белка. Боковые цепи,

содержащие ионогенные группы

Рисунок 41: Структура небелковых аминокислот (остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, гистидина, лизина и аргинина), помимо

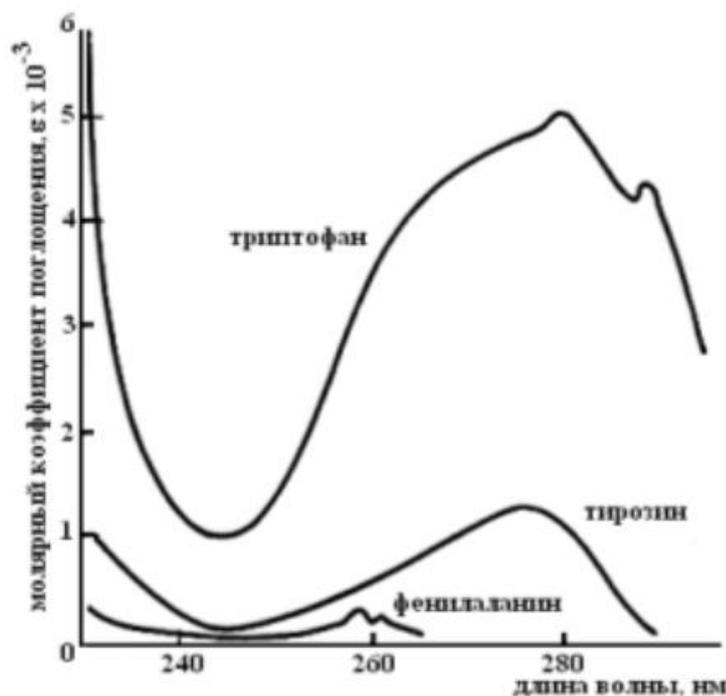


образования водородных связей участвуют в ионных взаимодействиях как внутри белка, так и с другими молекулами. Остатки цистеина открывают возможность участия белка в окислительно-восстановительных процессах, а также служат предшественниками остатков цистина, образуя дисульфидные мостики — дополнительные факторы стабилизации белковой структуры.

В то же время нельзя не заметить, что многообразие функциональных групп белковых аминокислот не столь уж велико. Однако их химические возможности резко обогащаются в рамках специфической белковой структуры за счет образования пространственно организованных ансамблей. И все же для многих задач функциональных групп белка недостаточно, для их решения привлекаются специфически связываемые ими лиганды — ионы металла, хромофорные группы, коферменты и т.п.

Физические свойства аминокислот

Растворимость аминокислот определяется ее радикалом, его гидрофобность уменьшает растворимость аминокислоты.



Ни одна из главных аминокислот не поглощает свет в видимой области, лишь три из них поглощают свет в близком ультрафиолете.

Наиболее сильно поглощает триптофан (максимум поглощения около 280 нм), значительно слабее тирозин (280 нм) и еще слабее фенилаланин (около 260 нм). Большинство белков содержит тирозин, поэтому распространенным методом определения концентрации белков является измерение оптической плотности при 280 нм. Цистин обладает слабым поглощением при 240 нм благодаря дисульфидной группе. Все аминокислоты

Рисунок 42: Спектры поглощения аминокислот

поглощают в дальнем ультрафиолете (<220 нм).

Химические свойства аминокислот

Кисотно-основные свойства

Кислотно-основные свойства аминокислот определяет одновременное присутствие в их структуре аминной и карбоксильной групп, которые, будучи предельно сближены, глубоко влияют друг на друга. В нейтральной среде, в довольно широком диапазоне pH, α-аминокислоты существуют как биполярные

ионы, поэтому обычная запись формулы аминокислот, например глицина — $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, условна. Правильнее было бы писать для нейтральных растворов $\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$.

Именно в такой форме биполярных ионов — цвиттер-ионов (устаревшее название "бетаиноподобная структура") — аминокислоты существуют в нейтральных растворах и кристаллах. Влияние положительно заряженной аммонийной, группы в α -положении делает α -карбоксильную группу значительно более сильной по сравнению с карбоксилем алифатических кислот. Так, если pK_a уксусной кислоты (pH , при котором диссоциация проходит наполовину) составляет 4,7, то у глицина pK_a карбоксила равен 2,34. Примерно такие же величины pK_a свойственны карбоксильным группам других α -аминокислот. Разумеется, карбоксильные группы, удаленные от α -аммонийной, например карбоксил аспарагиновой или глутаминовой кислот, не испытывают столь значительного влияния положительного заряда и по своим кислотным свойствам, по способности отдавать и принимать протон приближаются к обычным жирным кислотам. Тиоловая или сульфгидрильная группа цистеина и оксигруппа тирозина обладают очень слабыми кислотными свойствами. При pH -7 SH-группа ионизирована примерно на 8%, OH-группа — на 0,01%.

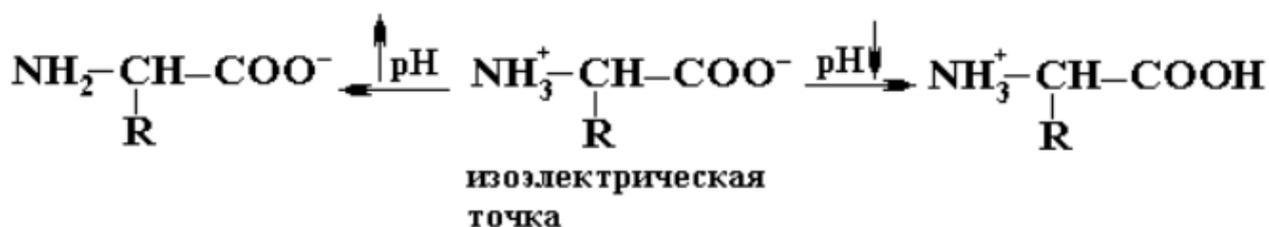


Рисунок 43: Изменение заряда аминокислоты в зависимости от pH

Точно так же α -аминогруппа в α -аминокислотах испытывает влияние карбоксилат-аниона, присоединенного к тому же углеродному атому, и становится значительно менее основной, чем аминогруппа первичных алифатических аминов — ее pK_a равен 9,6 — 9,7 в отличие от 10,7 для этиламина. Влияние карбоксильной группы на свойства аминогруппы, в частности на ее основность, падает по мере возрастания расстояния между ними, поэтому ϵ -аминогруппа лизина практически неотличима по химическим характеристикам от алифатических аминов, ее pK_a равен 10,5.

Если к нейтральному раствору α -аминокислоты, содержащему биполярные ионы, прибавлять кислоту, увеличивая концентрацию ионов водорода, последние будут присоединяться к карбоксилатным группам, превращая их в незаряженные карбоксильные группы. При этом аминокислота, в которой заряды первоначально были скомпенсированы, приобретет суммарный положительный заряд, в частности в электрическом поле она будет

перемещаться, к катоду. Напротив, если понижать концентрацию ионов водорода, добавляя щелочь, гидроксильные ионы будут реагировать с α -аммонийными группами, отщепляя протон и переводя их в незаряженные аминокислоты. В результате аминокислота приобретет суммарный отрицательный заряд, и в электрическом поле будет перемещаться к аноду: Значение рН, при котором как аминная, так и карбоксильная группы аминокислоты полностью заряжены и заряды скомпенсированы, называют изоэлектрической точкой (p_i). Для α -аминокислот, которые не имеют ионогенных групп в боковой цепи, величина p_i равна полусумме pK_a α -аминной и α -карбоксильной групп. Если аминокислота содержит дополнительные ионогенные группы, при расчете p_i следует учитывать их вклад.

Химические реакции аминокислот

Эти реакции разделяют на характерные для (α -аминогрупп, α -карбоксильных групп, протекающие с совместным участием обеих группировок и реакции с участием групп в составе радикала.

Реакции аминогрупп.

В целом эти реакции аналогичны реакциям алифатических аминов.

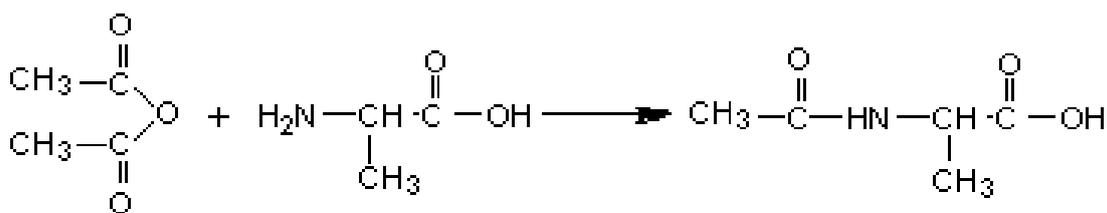
1 Формольное титрование. Взятый в избытке формальдегид легко соединяется со свободными (непротонированными) аминокислотами с образованием метилольных производных. В результате аминокислота в изоэлектрической точке отдает протон аминокислоты цвиттер-иона.



Освобожденные протоны могут быть оттитрованы NaOH до появления окраски фенолфталеина (рН 8,0). Формольное титрование - аналитический метод определения содержания аминокислот.

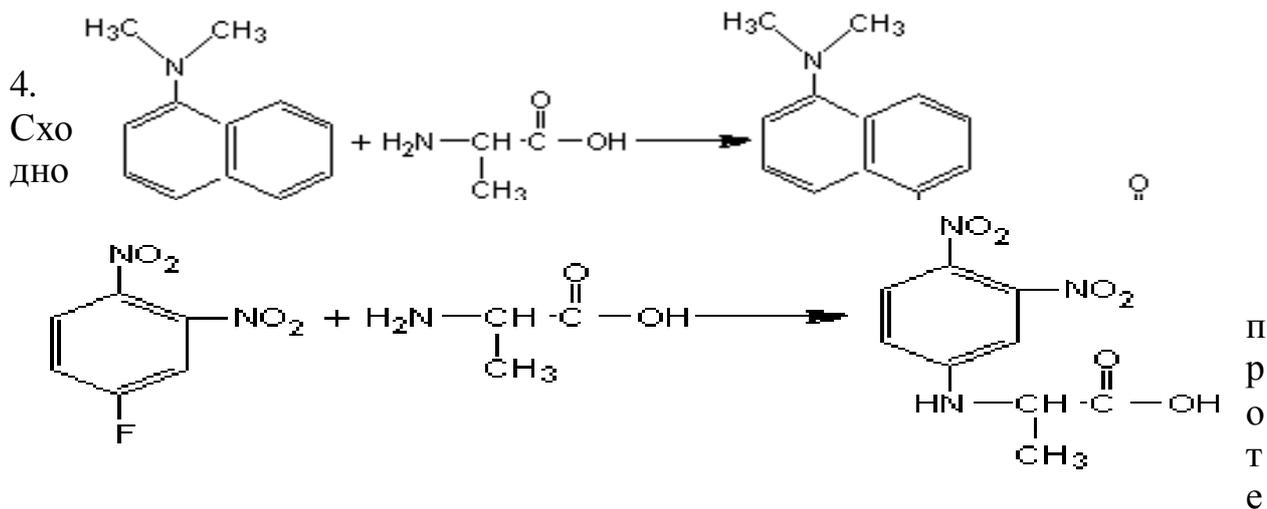
2 Ацилирование активированными производными кислот в присутствии основания, связывающего выделяющуюся кислоту, протекает достаточно легко. К таким реакциям, например, относят: — ацилирование аминокислот уксусным ангидридом

Данс илир



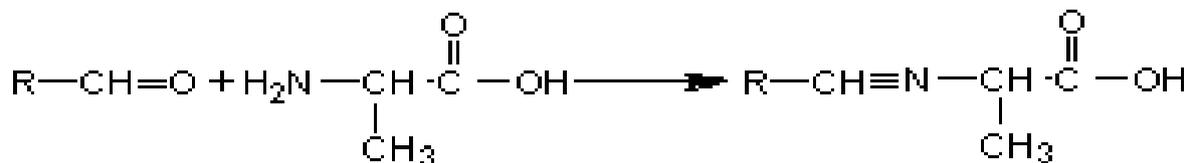
3. Данс илир

ование — реакция с хлоратридом метиламинонафталинсульфокислоты (дансилхлоридом), — позволяющая превратить аминокислоту во флуоресцирующее соединение.

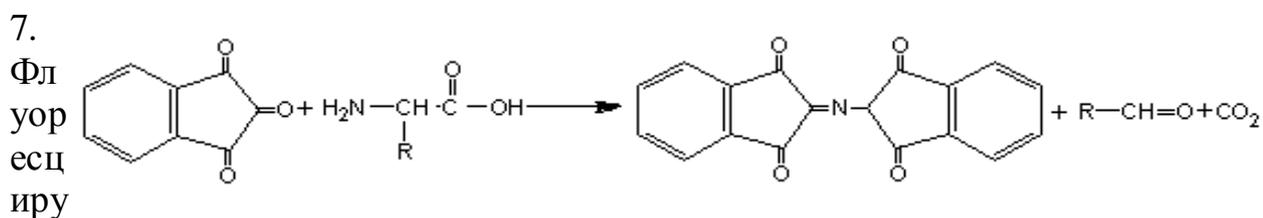


кает арилирование весьма активным 1-фтор-2,4-динитробензолом — реакция динитрофенилирования, сыгравшая большую роль в определении структуры пептидов.

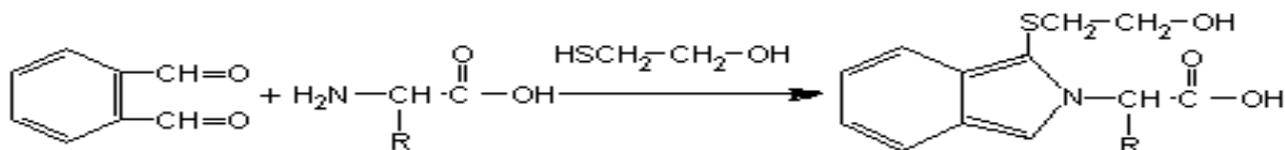
5. Реакция аминогруппы с альдегидами приводит к образованию непердельного соединения — так называемого основания Шиффа, в котором основность азота существенно понижена. Эта реакция обратима, и в кислой среде альдегид отщепляется с регенерацией аминокислоты. Для основания Шиффа характерна близость двойной связи к асимметрическому центру, что может способствовать рацемизации аминокислоты за счет миграции двойной связи к атому углерода. Гидрирование двойной связи в основании Шиффа, например боргидридом натрия, стабилизирует связь C—N.



6. К аналитически важным реакциям с карбонильными соединениями относят взаимодействие аминокислот с трикетогидриндегидратом (нингидрином). На этой реакции основано как качественное, так и количественное определение аминокислот (в том числе в автоматических анализаторах).



ющие производные образуются при реакции α -аминокислот с о-фталевым альдегидом в присутствии меркаптоэтанола. Эта реакция позволяет определять



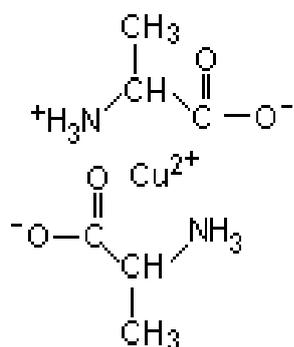
очень малые, порядка пикомолей, количества аминокислот.

Реакции карбоксильных групп

Эти реакции аминокислот в определенной мере соответствуют реакциям алифатических карбоновых кислот. Этерификация протекает в безводных спиртах в присутствии кислотных катализаторов. Так, фенилаланин этерифицируется почти количественно в безводном метаноле в присутствии соляной кислоты или (лучше) тионилхлорида. Эфиры аминокислот — важные исходные вещества для пептидного синтеза — могут гидролизоваться, в особенности в щелочной среде (реакция омыления). Обработка эфиров аминокислот безводным аммиаком превращает их в амиды. Для временной защиты α -карбоксильных групп, необходимой при пептидном синтезе, их превращают в трет-бутиловые эфиры путем реакции с изобутиленом в присутствии серной кислоты. Такие эфиры устойчивы в слабощелочных средах, но избирательно расщепляются кислотами с регенерацией свободной карбоксильной группой.

Реакции с совместным участием α -аминной и карбоксильной групп

1 Соли аминокислот с некоторыми ионами металлов, в частности с ионами двухвалентной меди, никеля, кобальта, образуются при участии как карбоксилат-иона (ионная связь), так и аминогруппы (координационная связь), причем



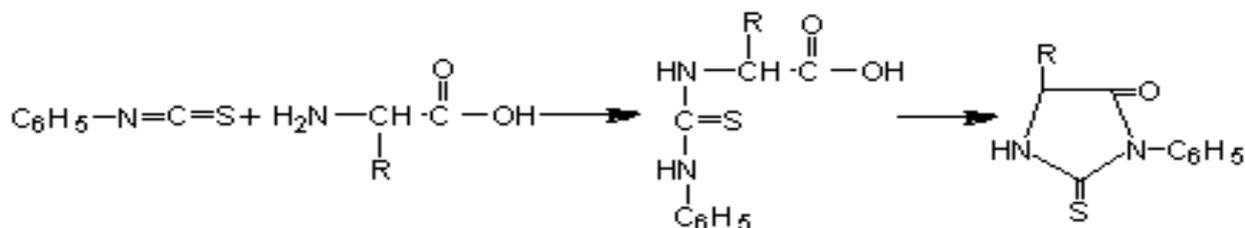
возникают весьма устойчивые бициклические (клешнеобразные, или хелатные) структуры, в которых ион металла координирован с двумя молекулами аминокислоты, например медная соль лизина, в образовании которой участвуют карбоксильная и аминная группа при углеродном атоме. ϵ -Аминогруппа в комплекс не входит и остается свободной, что может,

быть использовано для проведения реакций, специфически затрагивающих только удаленную аминогруппу. Такие комплексы интенсивно окрашены, например комплексы меди с аминокислотами — в фиолетово-голубой цвет. Такая реакция называется биуретовой.

2. Известны реакции, переводящие аминокислоты с участием как аминной, так и карбоксильной групп в циклические структуры. Так фосген превращает α -

аминокислоты в так называемые N-карбоксамидриды, легко полимеризующиеся с отщеплением CO_2 и образованием полиаминокислот.

3. Очень важна реакция аминокислот с фенилизотиоцианатом, которая сначала приводит к производному по α -аминогруппе — фенилтиокарбамил-аминокислоте. Фенилтиокарбамил-аминокислоты и некоторые их аналоги



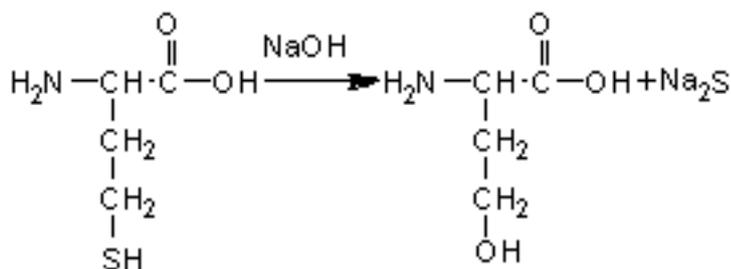
интенсивно поглощают в ультрафиолетовом свете, что используют при количественном определении аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обработка кислотами приводит к внутримолекулярной циклизации фенилтиокарбамил-аминокислоты с образованием фенилтиогидантоина. Эти производные аминокислот играют важную роль в анализе первичной структуры белка.

4. Две молекулы одной и той же или разных аминокислот могут ковалентно связываться друг с другом при помощи замещенной амидной связи, называемой **пептидной** с образованием **дипептида**. В образовавшемся дипептиде остается по одной свободной (следовательно, реакционноспособной) аминной и карбоксильной группе. Поэтому к дипептиду с образованием пептидной связи последовательно могут присоединяться другие аминокислоты, образуя три-, тетра-, ... олиго- и полипептиды. В водной среде равновесие этой реакции сдвинуто в сторону образования свободных аминокислот. Синтез как *in vivo*, так и *in vitro* осуществляется непрямым путем после активации взаимодействующих групп (чаще карбоксила). Например, можно аминокислоты сначала превратить в хлорангидриды, а из них уже получить пептиды. Именно таким путем Э.Фишер синтезировал пептиды длиной до 20 аминокислот. Продукты обладали свойствами, общими с белками и продуктами их гидролиза, что и послужило доказательством справедливости теории пептидного строения белков. В настоящее время разработаны методы синтеза полипептидов произвольной длины и состава.

Реакции групп входящих в состав радикалов

1. Реакция Фоля на серусодержащие аминокислоты. При длительном нагревании жидкость, содержащая серусодержащие аминокислоты (цистеин, цистин, метионин) и белки, в которых присутствуют эти аминокислоты, буреет, и выпадает черный осадок сернистого свинца. Реакция протекает в два этапа. 1-й этап — отщепление SH-групп аминокислоты и переход серы из

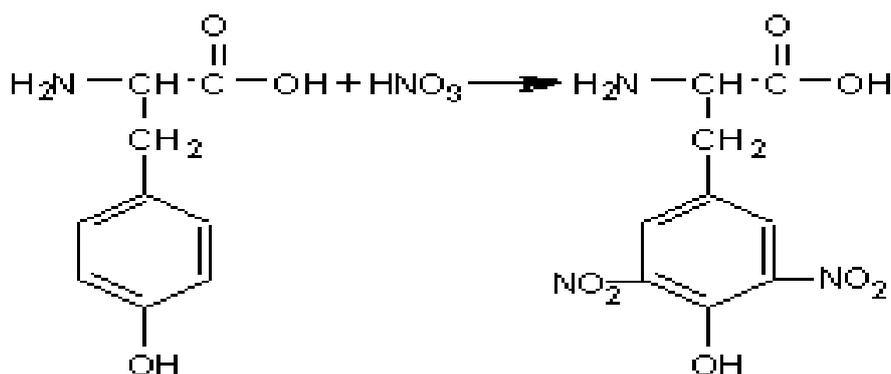
органического соединения в неорганическое. 2-й этап — качественное обнаружение ионов серы в растворе. Из функциональных групп, входящих в



радикалы аминокислот, отметим очень реакцию способную сульфгидрильную группу цистеина. Она легко окисляется с образованием дисульфида (цистина). При действии следовых количеств тяжелых металлов образуются меркаптиды. Поскольку SH-группа входит

в состав активных центров многих ферментов, то обработка тяжелыми металлами (например, Ag, Hg) приводит к инактивации ферментов.

2. Ксантопротеиновая реакция. При наличии в растворе циклических аминокислот или белков, в которых присутствуют эти аминокислоты, появится



желтое окрашивание за счет нитрования бензольного кольца

Функции аминокислот

Функции белковых аминокислот:

1. Входят в состав белков, белковые аминокислоты встраиваются в полипептидную цепь на рибосоме. Они закодированы в геноме.
2. Входят в состав пептидных антибиотиков, гормонов
3. Участвуют в обменных процессах, биосинтез

Входят в состав пептидных антибиотиков, гормонов

Целый ряд "небелковых" аминокислот участвует в процессах обмена. Таковы, в частности, гомосерин, аргинин янтарная кислота, полуальдегид аспарагиновой кислоты — промежуточные продукты биосинтеза белковых аминокислот, азетидинкарбоновая кислота - обычный компонент клеточного сока растений, таурин находится в желчи в составе конъюгатов желчных кислот.

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) – нейромедиатор.

Масса модифицированных аминокислот входит в состав белков, изменяя их свойства

Пептиды

Если карбоксильная группа одной α -аминокислоты ацилирует аминогруппу другой аминокислоты, то образующуюся амидную связь называют пептидной, а само соединение — пептидом. Таким образом, пептиды представляют собой, соединения, которые построены из остатков α -аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Иногда для достаточно длинных пептидов применяют термин полипептиды. Заметим, что с участием аминокислот могут образовываться и другие амидные связи, например между γ -карбоксильной группой остатка глутаминовой кислоты и ϵ -аминогруппой лизина при сшивании цепей фибрина в ходе старения тромба. Такие связи, химически близкие пептидным, к последним не причисляют, иногда называют их изопептидными. Образование пептидных связей в воде термодинамически невыгодно, этим обусловлена необходимость предварительной активации взаимодействующих групп (чаще — карбоксильной группы) при химическом синтезе пептидной связи, а также при ее биосинтезе. Однако кинетически пептидная связь достаточно стабильна и ее гидролитическое расщепление происходит лишь при использовании химических катализаторов (кислот или щелочей) либо при катализе специфическими ферментами (пептидазами). Понятно, что в дипептиде, полученном конденсацией двух аминокислотных остатков, сохраняются как карбоксильная, так и аминная группы, поэтому присоединение к нему аминокислотных остатков может быть продолжено с обеих сторон, что открывает возможность образования очень длинных — в несколько сотен и даже тысяч аминокислотных остатков — пептидных цепей. В пептидной цепи различают N-концевой (или аминоконцевой) остаток, содержащий свободную аминогруппу, и C-концевой остаток, который несет свободную α -карбоксильную группу. .

Физико-химические свойства пептидов.

Физические свойства пептидов зависят от входящих в их состав аминокислот. Если в состав пептида входят фенилаланин, тирозин и триптофан, то пептид будет поглощать УФ излучение, максимум поглощения при длине волны 280 нм. Их растворимость в воде различается и определяется как длиной пептида, так и природой образующих его аминокислот. Чем больше в составе пептида гидрофобных аминокислот, тем менее пептид будет растворим в воде.

Подобно аминокислотам, пептиды, содержащие свободные аминную и карбоксильную группы, являются биполярными ионами и имеют изоэлектрическую точку. Но при определении изоэлектрической точки, большее влияние приобретают группировки радикалов аминокислотных остатков. Кисотно-основные свойства пептидов несколько отличаются от

свойств аминокислот, поскольку взаимное влияние аминной и карбоксильной групп в них значительно слабее, чем в α -аминокислотах, а в длинных пептидах им вообще можно пренебречь. В пептидах pK_a α -карбоксильной группы заметно выше, чем в аминокислотах, и составляет, например, для аланил-аланина 3,12 (ср. с pK_a 2,34 для карбоксила аланина и 4,7 для уксусной кислоты). Для карбоксильной группы аланил-аланил-аланина pK_a — 3,39; с дальнейшим ростом цепи сохраняется значение, близкое к 3,4.

Некоторое повышение кислотности по сравнению с карбоксилем уксусной кислоты следует приписать влиянию соседней пептидной связи. Аналогично альфа-аминогруппа в пептидах становится менее основной, чем в α -аминокислотах: pK_a α -аммонийной группы составляет 9,69 для аланина, 8,30 для аланил-аланина, 8,03 для аланил-аланил-аланина и с дальнейшим удлинением цепи не меняется.

В остальном химические свойства α -аминной и карбоксильной групп пептидов качественно близки свойствам аминокислот. В частности, они вступают в те же реакции, которые были описаны для аминокислот, кроме протекающих с одновременным участием обеих функциональных групп. Такие реакции для пептидов не характерны. Исключением является довольно легкая циклизация эфиров и некоторых других производных дипептидов, в которых активирована карбоксильная группа, приводящая к дикетопиперазинам: В сильнощелочных растворах пептиды дают окрашенные комплексы с ионами меди, построенные весьма сложно. На этом основана так называемая биуретовая реакция. Разумеется, пептиды могут также вступать в реакции за счет функциональных групп, содержащихся в боковых цепях аминокислот.

Синтез пептидов

В клетках прокариот пептиды синтезируются специальными транспептидазами не матричным путем. У эукариот структура пептидазакодирована в геноме, в виде более крупной полипептидной молекулы белка предшественника, происходит сначала транскрипция, затем на матрице мРНК рибосома осуществляет биосинтез белка предшественника, который затем подвергается ограниченному протеолизу специфическими ферментами, которые, действуя на строго определенные связи, высвобождают активные пептиды..

Функции пептидов

1. Пептиды являются промежуточными продуктами деградации белка.
2. Пептидные антибиотики в большинстве своем синтезируются микроорганизмами по особому нематричному механизму и содержат в своем составе ряд небелковых аминокислот, а также D-изомеров. Многие из них являются циклопептидами. Среди таких антибиотиков отметим циклодекапептид грамицидин S — антимикробный агент широкого спектра

действия. Следует обратить внимание на присутствие в молекуле небелковой аминокислоты - орнитина - и D-изомера фенилаланина. Стрелки показывают направление пептидных связей в цикле. Эффективным иммунодепрессантом служит другой циклопептидный антибиотик — циклоспорин, содержащий N-метилированные и другие небелковые аминокислоты (непредельную оксиаминокислоту, аминомасляную кислоту, остаток D-аланина). В последнее время обнаружены пептидные антибиотики, продуцируемые клетками животных, в особенности лимфоцитами. Они образуются по обычному пути биосинтеза белковых структур.

3. Пептидные гормоны, в более широком смысле — регуляторные пептиды, играют важнейшую роль в управлении метаболическими процессами в развитии организма, передаче сигналов. К их числу принадлежат некоторые короткие пептиды, например, окситоцин, стимулирующий сокращение матки и лактацию. Сходно построен нонапептид вазопрессин, подавляющий диурез и повышающий давление крови. Адренокортикотропный гормон (АКТГ), пептидная цепь которого состоит из 39 аминокислотных остатков, регулирует функцию надпочечников и может затрагивать целый ряд процессов, в том числе мотивацию, обучаемость, поведение. Меланоцитостимулирующий гормон контролирует образование меланина в пигментных клетках позвоночных, но влияет и на функционирование нервной системы, поведенческие реакции, а также развитие плода. Следует отметить, что функции пептидных гормонов, как правило, многозначны, причем нередко в них удается выделить участки последовательности, ответственные за отдельные типы биологической активности. Для пептидных гормонов характерны процессы посттрансляционной модификации: в случае а-меланоцитостимулирующего гормона — ацетилирование α -NH₂-группы и амидирование α -карбоксила.

4. Энкефалины — пептиды, взаимодействующие с теми же рецепторами, что и морфин, и представляющие собой природные анальгетики, — синтезируются в виде предшественника, в пептидной цепи которого последовательности энкефалина Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu или Tyr—Gly—Gly—Phe—Met повторяются несколько раз. Им предшествуют и за ними следуют пары Arg—Arg, которые служат сигналом для действия специфической протеиназы, расщепляющей пептидную связь после такой пары остатков аргинина. Оба остатка аргинина затем отщепляются специфической карбоксипептидазой, высвобождающей энкефалин. Нередко оказывается, что пептиды могут имитировать поведение соответствующих пептидных фрагментов белка в его взаимодействии с другими биологическими молекулами, в частности с иными белками, например с рецепторами или структурообразующими молекулами. Так, пентапептидный фрагмент белка соединительной ткани ламинина, имеющий последовательность Tyr—Phe—Gly—Ser—Arg, ответствен за присоединение к этому белку клеток. Пентапептид такой же структуры способен препятствовать этому, по-

видимому, блокируя рецепторы на поверхности клеток, вовлеченные во взаимодействие с ламинином.

5. Пептиды-регуляторы иммунитета. К таким пептидам относят гормоны тимуса, тетрапептид тафтсин Thr—Lys—Pro—Arg (букв. обозначения см. в ст. Аминокислоты), являющийся фрагментом домена C_H2 иммуноглобулина G.

6. Среди пептидов известны в-ва, обладающие высокой токсичностью, -токсины из яда пчел и ос, пептиды из бледной поганки (фаллоидин, аманитины и др.), нейротоксины из яда змей, ботулинические токсин (блокирует нервно-мышечную передачу, нервного импульса), дифтерийный токсин (подавляет биосинтез белка).

7. К биологически активным пептидам принадлежат анзерин, глутатион и карнозин, участвующие в биохимических реакциях в тканях животных. Биологические функции глутатиона: защищает SH-группы ферментов и др. белков от окисления; восстанавливает H₂O₂ и др. пероксиды; связывает свободные радикалы; участвует в тиол-дисульфидном обмене и в обезвреживании многих чужеродных для организма соединений; восстанавливает рибонуклеотиды в дезоксирибонуклеотиды; переносит аминокислоты через мембрану клеток; является кофактором ряда ферментов, например, глиоксалазы и формальдегиддегидрогеназы.

8. Пептидные алкалоиды содержат в молекуле остаток пептида, обычно циклический (поэтому часто их называют циклопептидными алкалоидами). К ним также относят алкалоиды, содержащие в молекуле гидроксисти-риламиновый фрагмент. Пептидные алкалоиды наиболее распространены в растениях семейства крушиновых (Rhamnaceae). Содержатся в листьях, коре, корнях и др. частях растений в количестве от 0,02 до 1%. Некоторые виды растений, содержащие пептидные алкалоиды, используются в народной медицине для лечения диареи и дизентерии. Ряд пептидных алкалоидов проявляет активность против низших грибов и бактерий.

Белки

К белкам относят полипептиды, способные самопроизвольно формировать и удерживать определенную пространственную структуру. Нельзя указать такого порога, границы, которые резко отделяли бы белки от пептидов. Действительно, известная способность к образованию предпочтительных конформаций в растворах замечается уже у сравнительно коротких пептидов, более того, эта способность существенна для функции некоторых пептидов (например, гормонов), облегчая их взаимодействие с клеточными рецепторами. И всё же это только прообраз четкого соотношения между последовательностью аминокислот и пространственной структурой, которое составляет важнейшую отличительную особенность белка.

Стабилизация пространственной структуры требует хорошо развитой системы: нековалентных взаимодействий, что может быть достигнута лишь, начиная с некоторой длины полипептидной цепи. Известны белки, полипептидная цепь

которых содержит всего, лишь около пятидесяти аминокислотных остатков. К ним относятся, например, панкреатический ингибитор трипсина, фактор роста эпителия, некоторые белки оболочек бактериофагов. Однако такие случаи относительно редки и белки чаще всего содержат 100 — 400 аминокислотных остатков, в одной полипептидной цепи, образующей глобулярную структуру.

Впрочем, длина полипептидной цепи может быть и гораздо большей, достигая тысячи остатков и более. Известны и так называемые полибелки. Они представляют собой еще более длинную полипептидную цепь, формирующую последовательно несколько вполне автономных как в структурном, так и в функциональном отношении глобул, которые после разрезания полибелка по местам "перетяжек" протеиназами существуют как независимые друг от друга ферменты. Видимо, сам по себе механизм биосинтеза не накладывает существенных ограничений на длину полипептидной цепи белка.

Следует подчеркнуть, что переход от пептида к пространственно структурированной, компактной белковой глобуле определяется не механическим удлинением полипептидной цепи, а специфической последовательностью аминокислотных остатков. Иными словами, вовсе не обязательно случайно построенная полипептидная цепь самопроизвольно образует компактную пространственную структуру. Весьма вероятно, что способность к самосборке свойственна ограниченному кругу последовательностей, среди которых и те, что соответствуют природным белкам и отобраны в ходе эволюции. Во всяком случае, известны последовательности аминокислот, не свертывающиеся в компактную структуру.

Столь большое значение, которое придают самосборке пространственной структуры как отличительному признаку белка, объясняется тем, что именно она служит основой всех свойств белка, прежде всего его биологической функции. Физические характеристики белка как полимера полностью определяются его способностью формировать компактную глобулу, от особенностей которой зависит и олигомеризация многих белков. Химические и функциональные свойства белков зависят от специфических взаимодействий функциональных групп, сближенных, в его пространственной структуре. Вследствие этого поведение этих групп в белках коренным образом отличается от их реакционной способности в аминокислотах и небольших пептидах. Соответственно белок может функционировать, т.е. выступать в качестве фермента, структурного или транспортного белка, регулятора, токсина, ингибитора только потому, что он обладает вполне определенным пространственным строением.

В белке также, как и в пептиде аминокислоты соединены в полипептид пептидными связями, и имеется N-конец (начало) и C-конец(хвост).

Физико-химические свойства

Физико-химические химические свойства белков и пептидов сходны и зависят от аминокислот, входящих в их состав. Единственное отличие связано с изоэлектрической точкой определяется прежде всего группировками радикалов аминокислот, причем тех которые экспонированы на поверхность. N- и C-концевыми группировками можно пренебречь. Таким образом, свойства белка определяются радикалами аминокислот, экспонированными на поверхность.

Классификация белков

По составу белки разделяют на:

1. Простые. Состоят только из полипептида.
2. Сложные. Содержат компонент непептидной природы, называемый **простетической группой**. В качестве простетической группы могут выступать липиды (в липопротеидах), углеводы (в гликопротеинах), фосфаты (в фосфопротеинах), гемы (в гемопроотеинах), флавиновые нуклеотиды (в флавопротеинах), ионы металлов (в металлопротеинах) и др.

По форме молекулы белки разделяют на:

1. Глобулярные – представляют собой плотную компактную структуру по форме близкую к сфере. Обычно хорошо растворимы в воде, легко диффундируют.
2. Фибриллярные - вытянутые длинные молекулы, обычно нерастворимы (кератин, миозин, коллаген). К фибриллярным белкам относятся сократительные белки мышц актин и миозин, белки микротрубочек в составе ресничек и жгутиков эукариот и т.д.

Как можно видеть данные виды классификаций не являются удовлетворительными, так как в одном классе слишком много разнообразных белков. Более точной и наиболее используемой является классификация по функции.

По функции белки разделяют на:

1. Ферменты. Практически все реакции в организме - ферментативные. К настоящему времени известно более 2000 ферментов.
2. Транспортные белки делятся на две группы: транспортеры через мембрану и «растворимые транспортеры». К транспортерам через мембрану относят пермеазы и порины, осуществляющие пассивный транспорт, и транспортные АТФ-азы, осуществляющие активный транспорт. Система транспорта через мембрану характерна как для одноклеточных, так и у многоклеточных организмов (в основе все равно клетка). У многоклеточных организмов кроме мембранных транспортных белков, осуществляющих обмен между клеткой и окружающей средой, есть и специализированные белки, которые осуществляют транспорт веществ по кровеносной системе. Функция

гемоглобина - транспорт кислорода, сывороточного альбумина - транспорт жирных кислот, гидрофобных аминокислот, стероидных гормонов и т.д.

3. Пищевые и запасные. Использование белков в качестве резервных невыгодно с энергетической точки зрения. Однако это необходимо для обеспечения роста потомства: белки семян, яичный белок (овальбумин), казеин молока и т.д. Эти белки являются источником аминокислот и/или других молекул, или энергии для построения собственного организма. Именно поэтому и в семенах и яйцах имеется достаточный запас однородного белка, как запас аминокислот для роста и развития организма, так и энергию для этого организма, но в значительно меньшей степени.

4. Сократительные и двигательные. Актин и миозин обеспечивают сокращения мышц высших животных. Миозин также является АТФ-азой, то есть для обеспечения работы мышц расходуется энергия гидролиза АТФ. Тубулин – белок, из которого построены микротрубочки, за счет их происходит движение ресничек, жгутиков.

5. Структурные. Придают прочность ткани. Коллаген, эластин – основные белки соединительной ткани, обеспечивают прочность сухожилий, связок и т.д. Волосы, ногти, когти состоят почти исключительно из белка кератина. Шелк и паутина – из белка фиброина.

6. Защитные. Очень разнообразная группа белков. К ним можно отнести антитела, обеспечивающие узнавание чужеродных белков и полисахаридов и запуск защитных реакций. Фибриноген и тромбин обеспечивают свертывание крови, защищая организм от кровопотери при механических повреждениях. Змеиные яды, микробные токсины – защищают от других организмов. В эту же группу можно отнести ферменты, обеспечивающие трансформацию чужеродных веществ.

7. Регуляторные. Гормоны. Репрессоры (регулируют биосинтез). Сюда же можно отнести белки-рецепторы, вмонтированные в плазматическую мембрану и служащие для преобразования различных сигналов от других клеток и органов.

8. Прочие. Функции белков настолько разнообразны, что некоторые из них трудно отнести к какой-то группе. Например, плазма некоторых арктических рыб содержит белки со свойствами антифриза, что позволяет им переносить отрицательные температуры.

Еще на заре современной химии белка датский биохимик К.Линдерштрем-Ланг предложил рассматривать четыре уровня организации белковой молекулы: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Эта классификация закрепилась в литературе, поскольку в ней отразились реальные ступени формирования пространственного строения белковых молекул.

Первичная структура белка

Первичной структурой называют последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. Она кодируется структурным геном данного белка и содержит в себе все необходимое для самоорганизации его пространственной структуры. Последовательность аминокислот образуется в результате трансляции мРНК. Однако первичная структура зрелой белковой молекулы далеко не всегда полностью совпадает с непосредственным продуктом трансляции, который, как правило, подвергается более или менее существенной ко- и посттрансляционной модификации, процессингу, причем могут изменяться аминокислотные остатки, длина полипептидной цепи и т.п.

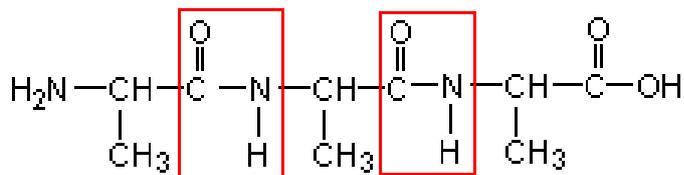


Рисунок 44: Первичная структура белка, красным прямоугольником отмечена пептидная связь.

Аминокислоты полипептиде соединены пептидной связью. Таким образом первичная структура белка образована пептидными связями. Традиционное изображение пептидной связи не вполне правильно передает ее электронную структуру. Двойная связь $\text{C}=\text{O}$ карбонильной группы

поляризована и в определенном смысле может быть представлена как одинарная связь с разделением зарядов, причем отрицательный заряд локализуется на атоме кислорода. Изучение кристаллических структур соединений, содержащих амидную связь, показало, что расстояние $\text{C}-\text{O}$ в них примерно на 10% больше свойственного карбонильной группе в альдегидах и кетонах. Напротив, связь $\text{C}-\text{N}$ за счет смещения свободной электронной пары азота к углероду приобретает в определенной мере характер двойной и укорочена опять-таки примерно на 10%. По Л.Полингу, электронная структура пептидной связи передается двумя резонансными структурами, причем на долю структуры II с двойной связью углерод—азот в гибриде приходится около 40%. В результате азот пептидной связи практически полностью утрачивает основность. Таким образом, пространственное строение полипептидной цепи может быть представлено как последовательность плоских элементов — пептидных группировок, соединяющихся между собой через $\text{C}-\alpha$ -атомы, которые служат своего рода шарнирами. Вращение плоских пептидных группировок может происходить вокруг двух простых связей, которые соединяют атом азота с $\text{C}-\alpha$ -атомом ($\text{N}-\text{C}_\alpha$) и $\text{C}-\alpha$ -атом с углеродом карбонильной группы ($\text{C}_\alpha-\text{C}(=\text{O})$). Жестких запретов для вращения вокруг этих связей нет, однако есть некоторые предпочтительные конформации.

Последовательность аминокислот в полипептиде определяет их дальнейшее взаимодействие между собой, а, следовательно, более высокие уровни организации белка. То есть структура и функции белковой молекулы

определяются ее аминокислотной последовательностью. Следовательно это очень важно определять первичную структуру белка.

Определение состава белка

Но несколько более простой способ это определение состава белка. Это позволяет определять: какие аминокислоты и в каком количестве входят в

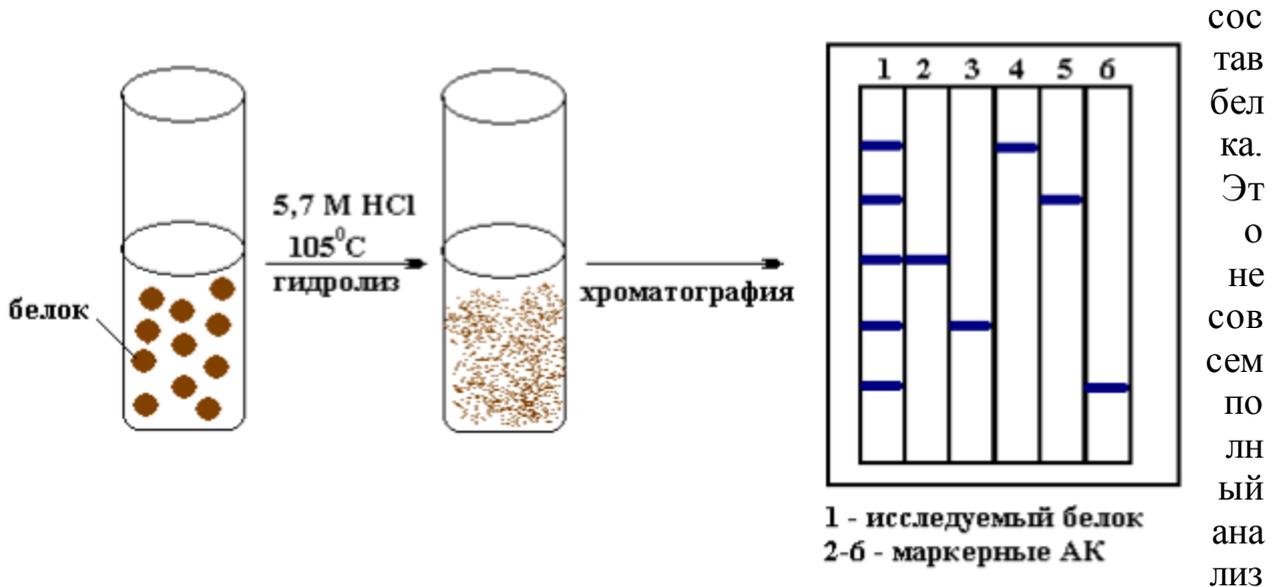


Рисунок 45: Схема определения аминокислотного состава белка

он дает достаточное количество информации. Определение аминокислотного состава необходимо для характеристики исследуемого белка, а также пептидных фрагментов, получаемых в ходе анализа первичной структуры. Для расщепления до свободных аминокислот пептид или белок подвергают исчерпывающему гидролизу, нагревая его с постоянной кипящей (5,7 М) HCl при 105 °С в течение 24 ч. Поскольку в таких условиях пептидные связи остатков изолейцина и валина гидролизуются не полностью, проводят также 48- и 72-часовой гидролиз. Ввиду этого для получения более надежных величин содержание валина и изолейцина оценивают, экстраполируя найденные значения к "бесконечному" времени, а содержание серина и треонина определяют - экстраполяцией к "нулевому" времени гидролиза. Некоторые аминокислоты вообще не выдерживают кислотного гидролиза и разрушаются практически полностью, поэтому для их определения требуются специально разработанные приемы. Образовавшуюся смесь аминокислот анализируют с помощью тонкослойной хроматографии. Этот метод основан на различной подвижности молекул на носителе. Смесь молекул наносят на слой носителя (на пример бумага или пластинка со слоем силикагеля) и край погружают в растворитель (обычно смесь гидрофобных и гидрофильных растворителей). Под действием капиллярных сил растворитель начинает двигаться по носителю (вверх восходящая хроматография, вниз нисходящая), когда растворитель достигает нанесенного пятна смеси, молекулы растворяются и движутся вместе с носителем, чем меньше сродство молекулы к растворителю, тем быстрее она оседает на носитель, следовательно меньше

расстояние от старта (l), и наоборот, чем больше сродство молекулы к растворителю, тем l больше, расстояние пройденное от старта растворителем обозначают как L . Подвижность молекулы при хроматографии — это индивидуальный параметр для каждой молекулы в каждой отдельной системе растворителя. Подвижность или R_f рассчитывают по формуле:

$$R_f = l/L$$

Существуют специальные таблицы R_f в различных системах растворителей, по которым можно идентифицировать молекулы в исследуемых смесях и гидролизатах. Но обязательно использовать таблицы подвижности в системах растворителей, которые применялись для хроматографии, иначе данные будут искажены.

И так гидролизат белка разделяют методом тонкослойной хроматографии, затем хроматограмму проявляют (используя качественные реакции на аминокислоты, чаще всего с нигидрином), затем рассчитывают R_f или сравнивают с пробегом маркерных аминокислот (смотри рисунок). Так определяют какие аминокислоты входят в состав белка. Количество каждой аминокислоты в белке определяют, элюируя аминокислоту с носителя и определяя ее количество в пятне. Имея это значение, количество гидролизованного белка и нанесенного гидролизата, можно рассчитать количество аминокислоты в белке. В настоящее время используют автоматические анализаторы, впервые описанные У. Хтейном, С. Муром и Д. Спекмэном. Их конструкции весьма разнообразны, однако все они основаны на описанном выше методе.

Но более информативны методы определения аминокислотной последовательности.

Определение аминокислотной последовательности полипептидов методом Эдмана

При определении аминокислотной последовательности к белку добавляют фенилизотиоцианат (реагент Эдмана); в результате реакции происходит отщепление N-концевого остатка в виде его фенилтио-гидантоинового производного (реакция Эдмана). Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных производят с помощью жидкостной хроматографии под давлением. Оставшийся белок снова обрабатывают реактивом Эдмана, и снова по циклу. Этот метод позволяет автоматизировать процесс определения. Приборы позволяют проводить полностью автоматизированное определение последовательности полипептидов, содержащих до 30—40 остатков (в некоторых случаях до 60 или даже до 80 остатков) за один прогон. Но белки имеют большую длину, поэтому их расщепляют на более короткие фрагменты в идеальном случае длиной 30-40 аминокислотных остатков, при чем разрезание должно происходить не случайным образом а после определенных аминокислотных остатков. Этим требованиям отвечает расщепление

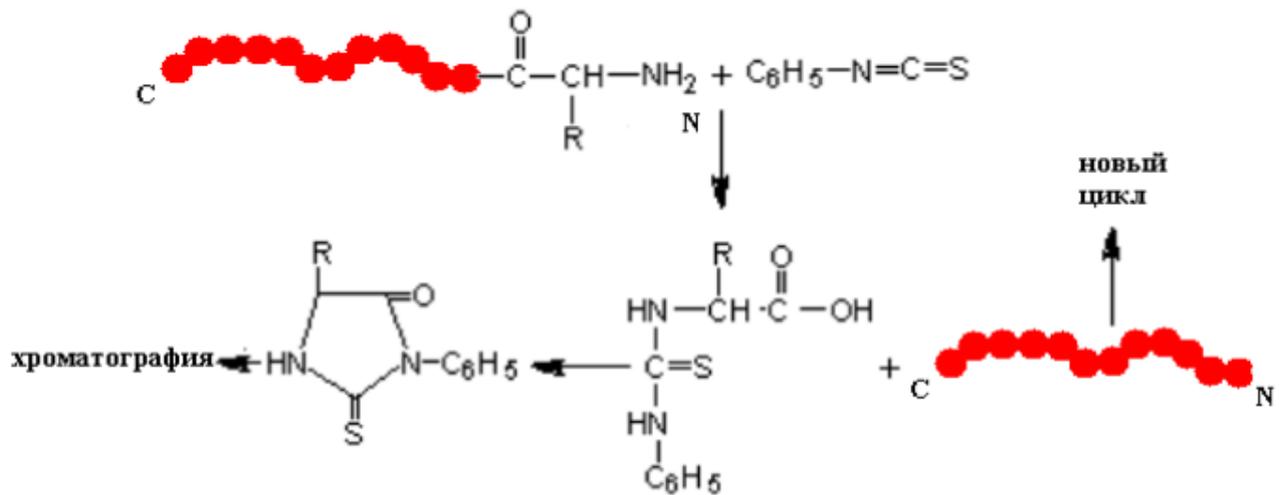


Рисунок 46: Схема определения аминокислотной последовательности по методу Эдмана

цианогенбромидом (CNBr), трипсином и о-иодозобензолом, также часто используют протеиназы, узнающие и разрезающие определенные последовательности аминокислот. Полученные фрагменты разделяют с помощью хроматографии и определяют последовательность.

Кроме того для определения первичной структуры белка все чаще прибегает к анализу последовательности нуклеотидов в соответствующем структурном гене или кДНК, что требует гораздо меньшего времени и дает в целом точные результаты. Однако такой путь не всегда практичен, так как при этом необходимо выделение и клонирование гена. Кроме того, он не позволяет обнаружить посттрансляционные модификации, без выявления которых исследование структуры белка нельзя считать завершенным.

Число установленных первичных структур быстро нарастает — еще в 1965 г. их счет шел на единицы, в 1975 г. было известно около 600, в 1984 г. — 2500 последовательностей, содержащих около 0,5 млн. аминокислотных остатков, к концу 1980 г. Эти цифры возросли соответственно до 14400 и 4 млн.

Белки, выполняющие одинаковую функцию в организмах различных видов (например, гемоглобин) называются **гомологичными**. Обычно гомологичные белки — это полипептиды одинаковой или почти одинаковой длины. Во многих положениях всегда находятся одни и те же аминокислотные остатки, называемые **инвариантными остатками**. В других положениях аминокислоты варьируют от вида к виду, такие остатки называются **вариабельными**. Всю совокупность сходных черт в последовательностях гомологичных белков объединяют в понятие **гомология последовательностей**; наличие такой гомологии предполагает, что хозяева этих белков имеют общее эволюционное происхождение. Число остатков, по которым отличаются молекулы, пропорционально филогенетическому различию между видами. Например, цитохромы с лошади и дрожжей отличаются по 48 остаткам из 104, утки и курицы — по 4 остаткам, курицы и индейки — идентичны, свиньи, коровы и овцы

- также идентичны. Исследование гомологии последовательностей используют для составления эволюционных карт.

Прежде, чем переходить к другим типам структуры белков, напомним, что мы имеем в виду под двумя важными терминами.

Конфигурация - пространственная организация органической молекулы, определяемая наличием в ней 1) двойных связей, вокруг которых невозможно свободное вращение, 2) асимметрических атомов углерода с расположенными вокруг них в определенной последовательности замещающими группами. Отличительным признаком конфигурационных изомеров является то, что их нельзя превратить один в другой без разрыва ковалентной связи. Конфигурационные изомеры можно разделить.

Конформация – термин, используемый для описания пространственного расположения в органической молекуле замещающих групп, способных изменять свое положение без разрывов связей благодаря свободному вращению вокруг свободных одинарных С-С-связей. Различные конформации нельзя отделить друг от друга.

Вторичная структура

Вторичной структурой называют пространственное расположение атомов главной цепи молекулы белка на отдельных ее участках. В соответствии с этим определением любой участок белка имеет вторичную структуру. Иногда рассматривают как вторичную структуру только те ее элементы, которые являются периодическими: α -спираль и β -слой. Понятие вторичной структуры, как подчеркивается в его определении, относится не ко всей белковой молекуле в целом, а к отдельным, более или менее протяженным участкам ее полипептидной цепи. Вторичная структура обеспечивается нековалентными водородными связями между частично отрицательным кислородом карбонильной группы пептидной связи и частично положительным водородом амидной группы другой пептидной связи.

Следует различать два вида вторичных структур: регулярные и нерегулярные. К регулярным относят α -спираль β -слой, β -изгиб, к нерегулярным — неупорядоченный участок.

α -спираль

В 50-х годах Л.Полинг и Р.Кори, основываясь на данных о структуре кристаллов аминокислот и простых пептидов, рассмотрели возможные периодические конформации полипептидной цепи и пришли к выводу, что наиболее вероятна структура, названная ими α -спиралью. При этом в основу выбора именно этой вторичной структуры были положены следующие критерии:

1. Образование плотноупакованной компактной структуры без пустот и перекрывания атомов.

2. Максимальная насыщенность структуры водородными связями с тем условием, чтобы геометрия водородной связи C=O...H-N была близка к линейной.

3. Соблюдение межатомных расстояний и углов, свойственных аминокислотам и простым пептидам.

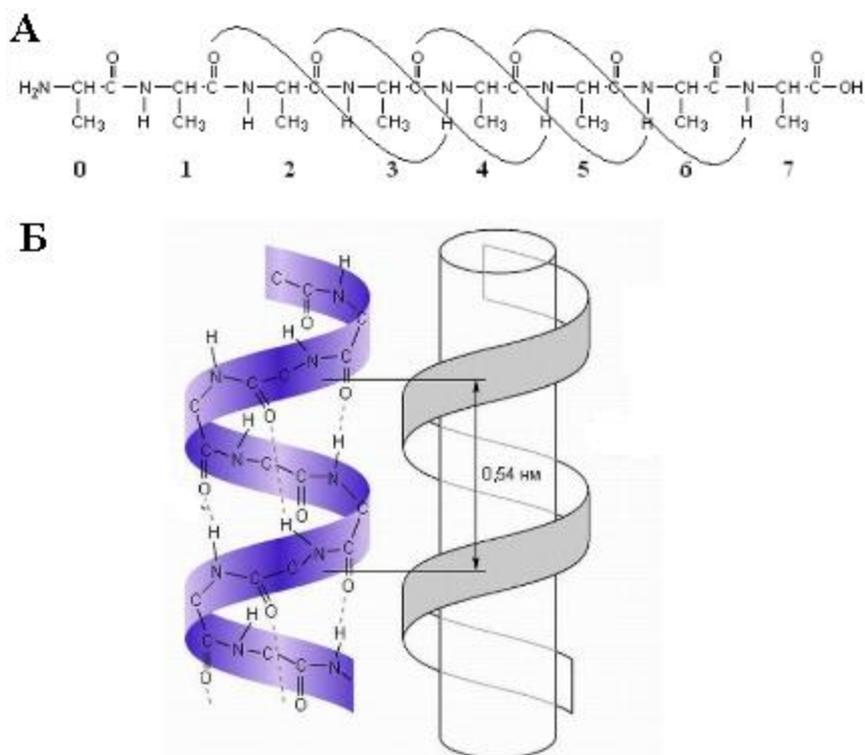


Рисунок 47: Структура α -спирали. А - схема взаимодействия аминокислот в α -спирали; Б - структура α -спирали

С соблюдением этих условий можно построить как правую, так и левую α -спирали, однако правая α -спираль оказывается энергетически несколько выгоднее левой, если пептидная цепь образована L-аминокислотами. Между C=O- и N—H-группами устанавливаются водородные связи так, что карбонильная группа i -го остатка образует связь с N—H-группой $(i + 4)$ -го, карбонильная группа $(i + 1)$ -го — с N—H-группой $(i + 5)$ -го и т.д.

То, что "над" карбонильной группой i -го остатка оказывается NH-группа, а не карбонил $(i + 4)$ -го остатка, примерно и соответствует 3,6 остатка на оборот спирали, отрицательный заряд концентрируется на кислороде карбонильной группы, а положительный — на атоме азота. Возможности образования водородных связей между пептидными группами в α -спирали использованы сполна. В этом смысле α -спираль является как бы насыщенной, внутренне замкнутой. Она не способна к взаимодействию с другими элементами вторичной структуры за счет образования водородных связей между пептидными группами. В формировании пространственной структуры белка важную роль играют нековалентные контакты, в которых участвуют боковые цепи аминокислот, входящих в α -спираль. При этом существенно, что на поверхности α -спирали оказываются сближенными боковые цепи аминокислот, разделенных двумя или тремя остатками в пептидной цепи. Если в этих позициях находятся гидрофобные аминокислоты, они образуют своеобразный гидрофобный гребень. Взаимодействие между такими гребнями используется как способ упаковки α -спиралей в пространственной структуре белка. Точно так же могут быть образованы и гидрофильные, в частности

заряженные, поверхности. Поэтому α -спираль - может быть чисто гидрофобной, что характерно для трансмембранных участков белков, или амфифильной, т.е. обладающей как гидрофобной, так и гидрофильной сторонами.

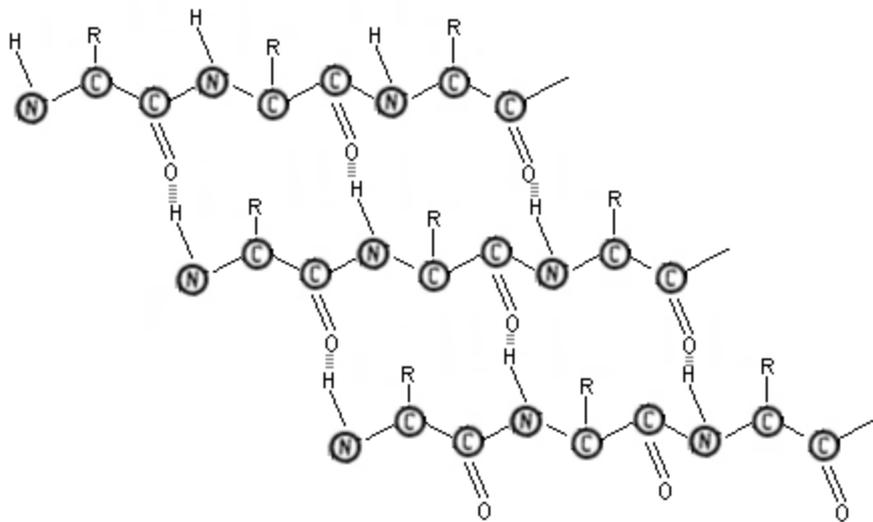
Длина α -спиральных участков в глобулярных белках относительно невелика и обычно составляет 5—15 аминокислотных остатков, редко превышая 3—4 оборота спирали; в фибриллярных белках она гораздо протяженнее. Иногда наблюдаются изломы спирали, обычно в местах включения остатков пролина, прерывающих систему водородных связей. При этом ось спирали отклоняется на 20—30°.

Не любой полипептид будет образовывать α -спираль. Так, если в цепи встречается подряд несколько остатков глутамата или аспартата, при нейтральных рН полипептид не примет конформации α -спирали вследствие взаимного отталкивания отрицательных карбоксильных групп. Аналогично α -спираль не будет образовываться в случае большого числа близко расположенных остатков лизина или аргинина, несущих положительный заряд. Аспарагин, серин, треонин, лейцин мешают образованию α -спирали вследствие большого размера R-групп. В пролине атом азота входит в состав жесткого кольца, что исключает возможность вращения вокруг N-C-связи. Кроме того, при атоме азота пептидной связи, образованной с участием амидной группы пролина, нет атома водорода. Следовательно, не может образоваться внутрицепочечная водородная связь. Как следствие, во всех случаях, когда в цепь включаются один или несколько остатков пролина, нарушается регулярная структура – образуются петля или изгиб.

β - структура

В отличие от α -спирали β -структура стабилизируется взаимодействиями между соседними отрезками пептидной цепи, т.е. несколько более отдаленными аминокислотами, которые могут даже принадлежать к разным полипептидным цепям. Эти отрезки могут быть направлены в одну сторону (N-концы взаимодействуют с N-концами) — параллельная β -структура или в противоположные (N-конец взаимодействует с C-концом) — антипараллельная β -структура. NH-группа какого-либо остатка в отрезке А дает водородную связь с карбонильной группой i -го остатка пептидной цепи В, а карбонильная группа того же аминокислотного остатка цепи А — с NH-группой $(i + 2)$ -го остатка в параллельной цепи В. Важно, что $(i + 1)$ -й остаток цепи В при этом как бы пропущен и его NH- и карбонильная группа во взаимодействии с цепью А не участвуют. Точно так же далеко не все C=O- и NH-группы цепи А участвуют во взаимодействии с цепью В.

Таким образом, два отрезка параллельной β -структуры соединяются водородными



связями, что приводит к формированию больших циклов из 12 атомов. Еще, раз нужно подчеркнуть, что в каждой из цепей во взаимодействии с соседней участвует только половина групп, которые могли бы образовать водородные связи.

Рисунок 48: Структура β -слоя

Следовательно,

каждый из этих участков пептидной цепи может образовать такую же систему, следовательно образовывать взаимодействия со следующим фрагментом полипептидной цепи, а его свободные группировки пептидных связей, со следующим, следовательно слой расширяется. Радикалы как в спирали не участвуют в образовании β -слоя, радикалы аминокислот направлены в верх относительно поверхности β -слоя, формируя как бы «ворс на ковре». Следует иметь в виду, что поверхность β -складчатого листа редко является плоской, чаще она закручена влево, если смотреть перпендикулярно ходу отрезков. Угол между соседними отрезками цепи составляет при этом около 25° . Многократное повторение такого мотива приводит к закручиванию листа в структуру, подобную винтовой лестнице. Описаны также "барабаны", получающиеся при сворачивании протяженного β -листа, когда крайние отрезки пептидной цепи смыкаются,

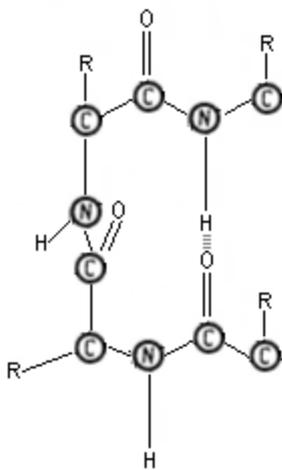


Рисунок 49: Структура β -изгиба

формируя между собой систему водородных связей, которая свойственна β -структуре. Очевидно, что β -структура в таких случаях утрачивает характер локального образования, подчас пронизывая всю белковую глобулу (и перерастает рамки данного в начале главы определения вторичной структуры). Учитывая это, к протяженным β -складчатым листам, играющим важную роль в формировании третичной структуры белка, применяют термин супервторичная структура.

β -изгиб

Как α -спираль, так и β -структура обычно представлены в глобулярных белках сравнительно короткими отрезками, поэтому значительная часть вторичной

структуры белка приходится на разного рода петли, позволяющие изменить направление пептидной цепи. Наиболее экономный структурный элемент, позволяющий повернуть полипептид на 180°, используя всего три пептидные группировки, получил название β-изгиба. β-Изгиб стабилизируется одной водородной связью. Его образованию могут мешать объемистые боковые цепи аминокислот, поэтому предпочтительно включение в него остатка глицина. Заметим, что β-изгиб практически всегда оказывается на поверхности белковой глобулы, поэтому нередко он играет существенную роль в ее взаимодействии с другими молекулами, например с иммуноглобулинами.

Неупорядоченная цепь

Неупорядоченные фрагменты чаще всего находятся на С-конце, также располагаются и внутри цепи. Эти участки не имеют своей точной оформленной структуры, а принимают ее уже в составе третичной структуры. С одной стороны это не достаточно стабильная структура, но очень часто такие петли участвуют в формировании функциональных центров белков, на пример, каталитических центров ферментов. И неупорядоченность отдельного фрагмента компенсируется полной упорядоченностью в составе уже третичной структуры белка.

Супервторичная структура белка

Появление термина супервторичная структура связан с тем фактом, что

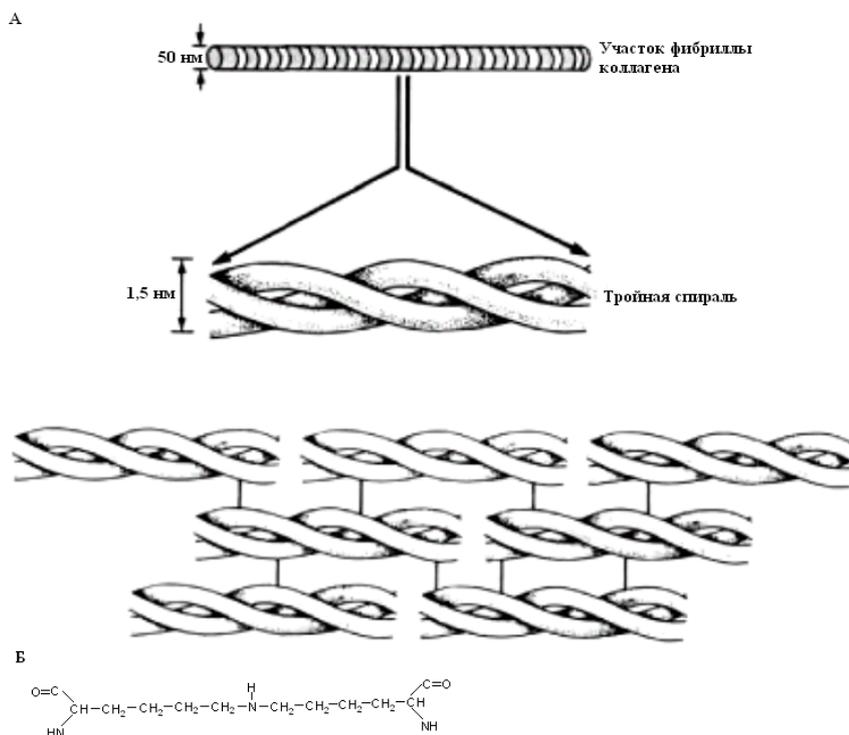


Рисунок 50: Супервторичная структура белка коллагена. А - организация фибриллы; Б - структура связи между остатками лизина

при накоплении данных о структуре белков выяснилось, что некоторые элементы вторичной структуры уже не совсем соответствуют этому названию. Так β-слой достаточной ширины может изгибаться, образуя бочонко- или лопастиподобные структуры. Такие структуры «пронизывают» всю белковую глобулу, но все-таки образуются частью полипептидной цепи, формируя что-то вроде центральной («градообразующей») структуры белковой глобулы. Следовательно, подобные конструкции

относятся к вторичным структурам, но их размеры позволяют прибавить приставку супер.

Второй такой пример появился при изучении структуры коллагена. У высших животных значительную часть организма составляет соединительная ткань. Три ее главных компонента **коллаген, эластин и протеогликаны**. Коллаген и эластин - примеры фибриллярных белков. Они формируют два основных типа волокон соединительной ткани: коллагеновые и эластические.

Коллаген - уникальная спираль, не встречается больше ни в каких белках (α - и β -спирали - хотя бы на отдельных участках глобулярных белков). Фибриллы состоят из повторяющихся полипептидных частиц **тропоколлагена**, уложенных вдоль фибриллы в виде параллельных пучков по типу "голова к хвосту". Состоят из 3 полипептидных цепей, плотно скрученных в виде трехжильного каната. Образуется палочкообразная молекула длиной 300 нм и толщиной 1,5 нм, массой около 300 000 Д. Три цепи имеют равную длину, в каждой содержится около 1000 аминокислотных остатков. В одних коллагенах все 3 цепи одинаковы, в других одинаковы 2, третья отличается. Каждая цепь также представляет собой спираль, отличную от α и β -структур. За счет высокого содержания пролина и оксипролина образуется жесткая изогнутая конформация. Дополнительно цепи связаны поперечными водородными и необычными ковалентными связями между остатками лизина. Коллаген практически нерастяжим из-за очень плотной скрученности и множества поперечных связей. С возрастом число поперечных связей растет. В очень эластичном белке соединительной ткани эластине содержится очень много лизина и мало пролина. Образуется спираль особого типа. Для нее характерно чередование спиралей из богатых глицином участков с более короткими участками лизина и аланина. 4 молекулы лизина ферментативно образуют одну молекулу десмозина.

Третичная структура белка

Третичной структурой называют распределение в пространстве всех атомов белковой молекулы. При этом не учитывают взаимодействия этой глобулы с соседними глобулами или субъединицами. Часто понятие третичной структуры сужают, концентрируя внимание на наиболее устойчивом ее элементе — свойственном данному белку способе укладки полипептидной цепи в пространстве. Характерно, что для больших групп эволюционно родственных белков, подчас очень значительно отличающихся по первичной структуре и, значит, по распределению всех атомов в пространстве, способ укладки полипептидной цепи остается в главных чертах неизменным. Это показывает, что допускаемое упрощение оправдано, так как оно отражает существенные черты третичной структуры.

Третичная структура — основа функциональности белка, которая требует точной пространственной организации больших ансамблей, построенных из множества аминокислотных остатков и их боковых групп. Такие ансамбли формируют активные центры ферментов, зоны связывания других

биологических молекул, эффекторные центры белков и т.д., поэтому нарушение третичной структуры белка (денатурация) неизменно приводит к утрате им способности функционировать.

В образовании третичной структуры участвует множество видов связей ковалентных и нековалентных, между радикалами аминокислотных остатков и элементами пептидных связей.

К ковалентным относятся дисульфидные связи, которые за счет большей прочности сильно стабилизируют белок. Дисульфидные связи образуются при окислении сближенных в пространственной структуре белка остатков цистеина в остатки цистина. Как уже упоминалось, это единственный тип ковалентных связей, участвующих в дополнение к обсужденным выше нековалентным взаимодействиям в стабилизации третичной структуры. Таким образом, наличие в белке дисульфидных связей вовсе не является непременным условием его стабильности. Однако немало белков, в том числе достаточно стабильных, вовсе их лишены. Например, РНК-аза один из самых стабильных белков, сохраняющий функциональность даже после десяти минут кипячения. По-видимому, стабилизация белковой структуры дисульфидными связями объясняется, прежде всего, тем, что они, сохраняясь денатурированном белке, резко сокращают число возможных конфигураций развернутой полипептидной цепи, понижая тем самым ее энтропию.

Типов нековалентных взаимодействий при формировании третичной структуры больше и, следовательно, именно они обеспечивают основную укладку и стабилизацию белковой молекулы.

Это прежде всего водородные связи, которые представляют собой электрические взаимодействия между частично положительно заряженным атомом одной группировки и частично отрицательным другой. Эти связи могут образовываться между карбонилем одного аминокислотного остатка и амидом другого, данные группировки являются элементами пептидной связи, участвуют в формировании вторичной структуры. При формировании третичной структуры также образуются водородные связи между элементами пептидной, но уже в неупорядоченных петлях, также добавляются водородные связи между частично заряженными группировками радикалов неионных гидрофильных аминокислот, увеличивая количество водородных связей. Второй вид связей сходных по своей природе с водородными — ионные. Это электрические взаимодействия между ионизованными группировками радикалов кислотных и основных аминокислотных остатков.

Последняя группа нековалентных связей — гидрофобные или ван-дер-ваальсовы, которые представляют собой перекрывания гидрофобных радикалов аминокислот, которые как и в мембранах, как бы изолируются от воды под гидрофильными фрагментами полипептида, взаимодействуя только друг с другом.

Учитывая факт, что третичная структура — основа функциональности белка и огромное многообразие белков, то структура каждого отдельного белка уникальна. Для определения третичной структуры белка используется метод рентгеноструктурного анализа полимерных молекул, принцип которого заключается в следующем. Пучок рентгеновских лучей направляют на кристалл белка, где они сталкиваются с атомами и происходит отклонение лучей от основной оси на определенный угол, проходя сквозь кристалл отклонившиеся лучи засвечивают пленку, в зависимости от атома, с которым произошло столкновение угол отражения отклонившиеся лучи будут суммироваться или взаимовычитаться, это явление называется дифракция. С учетом дифракции по пятнам на рентгенограмме и известны углах отклонения определяют положение атомов в кристалле и их типы (именно поэтому белок должен быть в виде кристалла, чтобы все атомы были фиксированы). И уже по полученным данным, определяют положение атомов в молекуле, то есть третичную структуру. Этот процесс очень сложный, но в настоящее время определена структура множества белков, как было сказано ранее каждая из них уникальна, и изучить структуру всех известных белков не возможно, и даже специалисты изучают строго определенные группы белков, но не смотря на это можно выявить общие тенденции в образовании структуры белка.

Гидрофобное ядро

Молекулы большинства белков находятся в воде и гидрофильные аминокислоты могут образовывать связи с водой, если бы все аминокислоты в белке были гидрофильны, то преобладали бы взаимодействия с водой, а не с

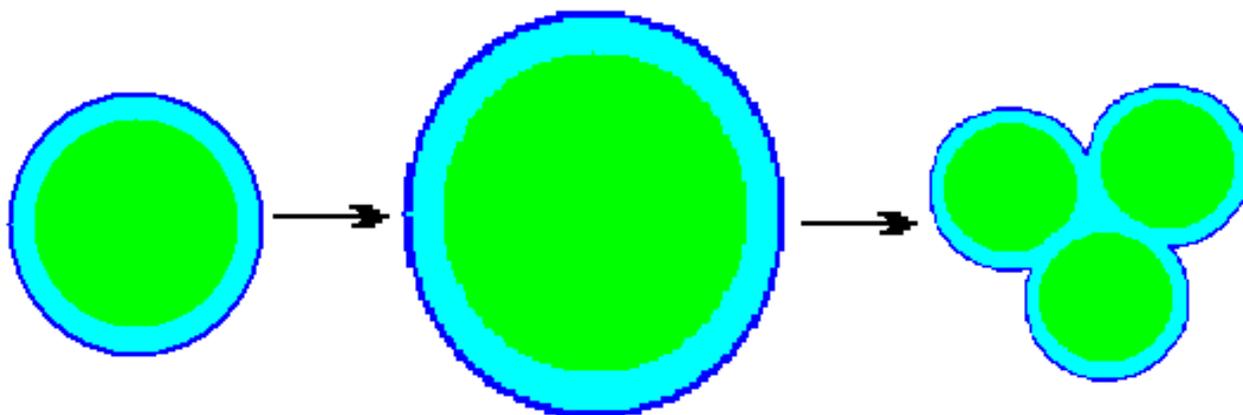


Рисунок 51: Эволюционное развитие ядра и оболочек белка. Зеленым отмечено гидрофобное ядро; голубым - гидрофильная поверхность; синим - гидратная оболочка

другими аминокислотами, и образование стабильной глобулы было бы не возможно. Поэтому часть аминокислот гидрофобные, они изолируются от воды под гидрофильными аминокислотами, создавая плотное компактное гидрофобное ядро, этому способствуют короткие ван-дер-ваальсовы связи, в результате молекула сворачивается в структуру по форме близкую к шару, так как у этой фигуры оптимальное соотношение поверхность/объем, и как

следствие она более энергетически выгодна. В гидрофобное ядро, которое, вовсе не обязательно приближается к сферической конфигурации, но более или менее компактно, обычно входит 20—30% общего числа аминокислотных остатков. В нем особенно представлены объемистые остатки лейцина, изолейцина, фенилаланина, валина. Гидрофобное ядро окружено наружной гидрофильной оболочкой, имеющей контакт с водой. В ней содержатся гидрофильные аминокислотные остатки взаимодействующие как друг с другом так и молекулами воды, образуя гидратную оболочку белка из связанной с ним воды. Но наряду с ними немало и боковых цепей гидрофобных аминокислот — до половины их общего содержания. Нередко образуются своего рода гидрофобные пятна, "лоскуты", которые придают поверхности белка мозаичный характер, чередуясь со строго гидрофильными участками. Такие гидрофобные выходы могут иметь функциональное значение — они формируют гидрофобные участки зон связывания субстратов и других лигандов, участвуют в белок-белковых взаимодействиях, в частности в стабилизации четвертичной структуры. Так же крупные гидрофобные участки поверхности белка характерны для интегральных мембранных белков.

Домены в белках

Свойственный белкам способ организации пространственной структуры — формирование гидрофобного ядра и мозаичной поверхности, содержащей как

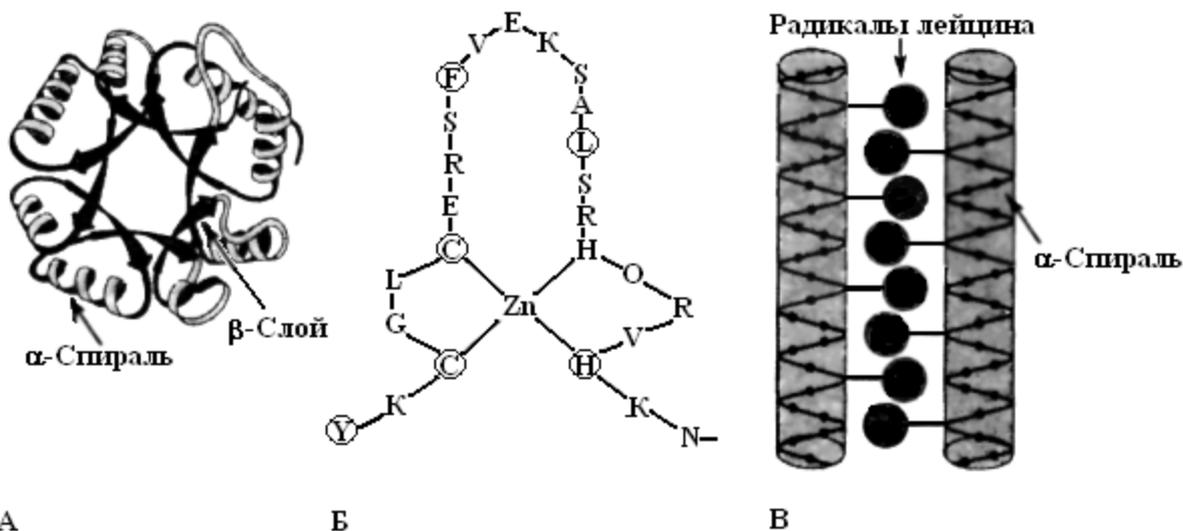


Рисунок 52: Примеры структуры некоторых доменов. А - домен пируваткиназы (тип β-бочонка), Б - "цинковый палец"; В - "лейциновая молния"

гидрофильные, так и гидрофобные элементы, — на первый взгляд, ограничивает размеры глобулы, поскольку с увеличением ее объема строго гидрофобное ядро будет составлять все меньшую долю. В какой-то мере это так, но ограничение затрагивает лишь размеры данным способом организованной структуры, а не молекулы в целом. Действительно, начиная примерно с молекулярной массы 14 - 16 кДа прослеживается тенденция к формированию белковой молекулы из двух (и более) в той или иной степени независимо образованных глобул, каждая из которых имеет свое гидрофобное

ядро. Такие глобулы — домены — формируются различными отрезками одной и той же полипептидной цепи. Доменами в белках называют области в третичной структуре, которым свойственна определенная автономия структурной организации. Автономия эта подчас столь значительна, что домены могут независимо от других частей белковой молекулы поддерживать и даже формировать пространственную структуру. Во многих случаях удается разделить домены, подвергнув белок ограниченному протеолизу. В рамках биологической функции данного белка домены нередко, хотя и не всегда, выполняют собственные задачи, и тогда структурная автономия домена дополняется функциональной. Например, нуклеотидсвязывающий домен дегидрогеназ, имеющий, независимо от конкретной функции того или иного фермента одинаковый способ укладки полипептидной цепи, ответствен за взаимодействие с одним из субстратов реакции — коферментом NAD или NADH. Аминоконцевые домены ферментов системы свертывания крови обеспечивают связывание с липидами мембраны и другими белками, аминоконцевые домены иммуноглобулинов формируют центр связывания антигена. Домен цинковый палец, представляющий собой β -слой из двух цепей с β -изгибом, дополнительно стабилизированы ионом цинка. Цинковый палец является ДНК-связывающим доменом у эукариот. Уникальная последовательность аминокислотных остатков образует уникальный набор связей с экспонированными в большой желобок группами азотистых оснований, в зависимости от последовательности нуклеотидов ДНК набор экспонированных групп будет варьировать, а, следовательно, набор аминокислотных остатков в «пальце» будет отличаться, все это обеспечивает связывание со строго определенными последовательностями нуклеотидов в ДНК. У прокариот такую функцию выполняет домен «спираль-поворот-спираль», одна из α -спиралей взаимодействует с ДНК, по тому же принципу что и в «цинковом пальце», короткая петля или поворот, обеспечивает поворот на 90° другой спирали, богатой основными аминокислотами, которые взаимодействуют с сахаро-фосфатным остовом ДНК. Чаще всего домены формируются автономным свертыванием последовательно расположенных участков полипептидной цепи, хотя известны случаи, когда пространственная структура домена образована двумя далеко отстоящими друг от друга отрезками первичной структуры белка.

Естественно в образовании третичной структуры участвуют взаимодействуя и элементы вторичной. По соотношению и взаимодействию этих элементов выделены следующие главные типы пространственной структуры:

1. α -Спиральные белки, построенные преимущественно из α -спиралей. Простейший структурный мотив в таких белках — пучок четырех α -спиралей, оси которых более или менее параллельны. Именно такую структуру имеют миогемэритрин, H-субъединица ферритина. Типично α -спиральными белками являются глобины.
2. β -Белки, образованные преимущественно β -складчатыми слоями. В большинстве таких белков β -слои наложены под небольшим углом или

ортогональны. Примерами таких белков могут служить пепсин и другие аспартильные протеиназы, супероксиддисмутаза, большое семейство белков—переносчиков метаболитов (например, жирных кислот).

3. α/β -Белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры чередуются. Обычно это приводит к формированию центрального β -складчатого листа, окруженного с обеих сторон α -спиралями, экранирующими его от воды. Этот тип пространственной структуры очень распространен. К нему принадлежат NAD-связывающие домены дегидрогеназ, триозофосфатизомераза и около десятка других белков, структурно близких к этому ферменту.

4. $(\alpha + \beta)$ -Белки, в которых α -спирали и отрезки β -структуры не чередуются, а скорее группируются с себе подобными так, что часть молекулы приобретает пространственную укладку чисто α -спирального типа (тип 1, см. выше), другая — чисто β -типа (тип 2), нередко с элементами- (α / β)-структуры. К этому типу относится лизоцим куриного яйца.

Существуют также уникальные структуры.

Денатурация белка

Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структуры белка, т.е. нарушение, разупорядочение системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной структуры. Денатурация, как правило, сопровождается утратой белком функциональных свойств, его инактивацией. Однако инактивация сама по себе не может служить надежным критерием денатурации. К денатурации не следует относить конформационные переходы в белке, при которых одна кооперативная система нековалентных взаимодействий перестраивается в другую. Принципиальная разница состоит в том, что в этом случае оба состояния упорядочены, тогда как характерным признаком денатурации является именно утрата упорядоченности, которая приводит к возрастанию энтропии системы. Однако встречаются, по-видимому, и случаи, когда белок претерпевает частичную денатурацию, например, вследствие утраты пространственной организации одним из образующих его доменов или нарушения системы нековалентных взаимодействий в каком-либо участке супервторичной структуры. Качественное рассмотрение показывает, что денатурация белка может быть вызвана действием ряда факторов.

По агентам воздействия выделяют два типа денатурации: физическая и химическая. Физическим денатурирующим агентом является температура. Так, повышение температуры приводит к возрастанию вклада энтропийного фактора, что обуславливает тепловую денатурацию, происходящую, как правило, скачкообразно. Температура денатурации белков различается и существенно зависит от других условий, например, многие белки заметно стабилизируются ионами кальция. Некоторые белки отличаются термостабильностью. Это особенно свойственно белкам термофильных организмов, адаптировавшихся к жизни при повышенных температурах. Например, протеолитический фермент, секретируемый термофильными

бациллами, — термолизин — сохраняет активность до 80 °С. Денатурация под действием температуры необратима, то есть при восстановлении оптимальной температуры белок не восстанавливает свою структуру.

Химическая денатурация происходит под воздействием на белок реагентов, нарушающих нековалентные взаимодействия, прежде всего систему водородных связей. Так как в составе третичной структуры белка существует несколько типов связей, и как следствие несколько механизмов.

Первый механизм — это конкуренция за водородные связи. Денатурирующий агент содержит частично положительные и отрицательные заряды, которые образуют водородные связи с группировками белка. И группировки в место связей между собой образуют связи с агентом и глобула распадается. Так действуют мочевины в больших концентрациях (6-8 М) гуанидин хлорид, гуанидин изотиоцианат.

Второй механизм — это изменение заряда групп. Это происходит при изменениях pH, при изменении pH среды группировки или протонируются, или депротонируются в результате взаимодействия между заряженными группировками разрушаются за счет изменения заряда, и как следствие молекула белка денатурирует. По этому механизму происходит денатурация с использованием кислот и щелочей.

Третий механизм — разрушение гидрофобного ядра. Так происходит денатурация с использованием органических растворителей. Органические растворители гидрофобные, и когда белок в них попадает уже поверхностные гидрофильные аминокислоты можно сказать «самоизолируются», тогда как гидрофобные аминокислоты ядра начинают взаимодействовать с растворителем, а не друг с другом, молекулу как будто выворачивает наизнанку. Но если правильно подобрать органический растворитель, то можно сохранить гидратную оболочку и тогда связи и среда белка не будут нарушены, и денатурация не произойдет, это позволяет использовать органические растворители для выделения и разделения белков.

Четвертый механизм совмещает в себе первый и третий. Заряженная группировка конкурирует за водородные связи, гидрофобная часть молекулы разрушает гидрофобные связи ядра. К таким агентам относятся ионные детергенты, самый известный из них додецил сульфат натрия или (SDS), по такому же механизму осуществляют денатурацию мыла.

Ренатурация белка

Денатурацию белка в определенных условиях *in vitro* удастся обратить, перейдя от развернутой полипептидной цепи к компактной глобуле, имеющей вполне определенную пространственную структуру. Этот процесс, называемый ренатурацией, моделирует, хотя и не в полной мере, свертывание полипептидной цепи в глобулу в ходе трансляции при биосинтезе белка. Как известно, пространственная структура белка определяется его первичной структурой. Известное соотношение один ген — один белок, в сущности,

эквивалентно утверждению, что генетически детерминированной последовательности аминокислот достаточно, для того чтобы однозначно предопределить ее свертывание в свойственную тому или иному белку третичную структуру. Разумеется, в общем случае такое заключение справедливо лишь для условий, близких к существующим в данной клетке при биосинтезе данного белка, которые могут включать в себя определенный диапазон рН, присутствие некоторых ионов, например ионов кальция, а также кофакторов, присущих этому белку, например коферментов, гема и т.п.

При соблюдении указанных условий будет достигнуто рассмотренное выше соотношение факторов, от которого зависит стабильность белковой глобулы, т.е. создадутся термодинамические предпосылки формирования нативной структуры — ренатурации белка. Это положение было подтверждено успешными опытами по ренатурации белков *in vitro*, проведенными впервые К.Анфинсеном и сотрудниками в 60-х годах, на панкреатической рибонуклеазе и лизоциме, а затем и на ряде других объектов. Однако не для всех белков химическая денатурация обратима, многие белки ренатурировать не удается, скорей всего это связано с тем, что нет возможности создать полностью необходимые для сворачивания условия, или в природе есть факторы не учитываемые исследователем.

Установлено, что при формировании пространственной структуры белка *in vivo* полипептидная цепь не предоставлена сама себе, а взаимодействует с целым рядом специализированных белков, получивших название шаперонов, функция которых — обеспечить быстрое нахождение правильной пространственной структуры. Известен ряд семейств шаперонов, которых особенно много среди так называемых белков теплового шока. Последние названы так, потому что они синтезируются клетками в больших количествах в ответ на воздействия, неблагоприятные для эффективного свертывания третичной структуры белков, в частности на повышение температуры. Однако они образуются и действуют и в нормальных условиях. Одно из семейств шаперонов составляют так называемые стресс-белки 70 эукариотических клеток, имеющие молекулярную массу около 70 кДа. Они образуют комплексы с еще не завершившимися свертывание полипептидными цепями, предотвращая их взаимодействие между собой и нежелательную агрегацию. Эти белки состоят из двух взаимодействующих между собой доменов. Один из доменов образует комплекс с участками развернутой полипептидной цепи, другой — связывает АТФ и способен расщеплять его, являясь медленно действующей АТФ-азой. При гидролизе АТФ белок переходит в другое конформационное состояние и его комплекс с полипептидной цепью распадается. То есть шаперон не сворачивает правильно, а разворачивает неправильное, критерием является количество энергии, поступившей в систему при гидролизе АТФ, хватило для разворачивания значит свернуто не правильно, не хватило — правильно.

Полипептидные цепи белков, которые подлежат транспорту из цитоплазмы, за счет образования комплексов со стресс-белками 70 удерживаются в развернутом, наиболее приспособленном для переноса через мембрану

состоянии. Продолжительность жизни таких комплексов задается, по-видимому, временем, требующимся для внутримолекулярного гидролиза АТР, связанного стресс-белками 70. Пока не ясно, катализируют ли эти белки непосредственно само образование вторичной или третичной структуры. Не исключено, что их роль ограничивается предотвращением нежелательных для этого процесса межмолекулярных взаимодействий, агрегации еще не свернутых полипептидных цепей. Еще одну группу широко распространенных белков, вовлеченных в формирование третичной структуры, составляют так называемые шаперонины — белки, кодируемые генами GroEL и GroES у *E.coli*. Белки GroEL образованы субъединицами с молекулярной массой около 60 кДа, которые формируют своеобразную четвертичную структуру, построенную из двух лежащих одно на другом колец по семь субъединиц в каждом. Предполагают, что частично свернутая полипептидная цепь располагается на поверхности такого кольца. Отдельные ее участки, связанные субъединицами шаперонина с различной прочностью, могут высвободиться из комплекса и формировать свойственную им вторичную структуру, не встречая помех со стороны соседних участков или других полипептидных цепей, удерживаемых в связанном состоянии. В таких условиях формирование регулярных элементов вторичной структуры происходит как бы поочередно. По завершении этого процесса комплекс распадается, что зависит, как и в рассмотренном выше случае, от расщепления АТР, связанного GroEL-белком. Белки GroES с молекулярной массой 10 кДа ассоциируют с белком GroEL и каким-то образом регулируют его АТР-азную активность и, значит, время жизни комплекса.

Четвертичная структура белка

Четвертичной структурой называют размещение в пространстве взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями белка.

В формировании четвертичной структуры участвуют не пептидные цепи сами по себе, а глобулы, образованные каждой из этих цепей в отдельности. Таким образом, понятие четвертичной структуры относится к ансамблю глобул. Взаимодействие между последними достаточно сильно, так что ансамбль выступает как единая молекула, в то же время каждая из объединившихся глобул — субъединиц — сохраняет значительную автономию, как правило, выраженную гораздо ярче, чем автономия домена в рамках третичной структуры. Известны, однако, случаи, когда два или несколько полипептидов составляют единую глобулу. Как правило, это является следствием ограниченного протеолиза — локального расщепления на отдельные отрезки первоначально целостной полипептидной цепи, образовавшей глобулу по обычным правилам формирования третичной структуры. Такие белки, естественно, не следует относить к числу имеющих четвертичную структуру.

Примером может служить инсулин. Его мономер построен из двух пептидных цепей А и В, содержащих соответственно 21 и 30 аминокислотных остатков.

В некоторых белках полипептидная цепь образует при свертывании несколько глобул (доменов), между которыми устанавливается система нековалентных взаимодействий. Последующее протеолитическое разрезание участков цепи, соединяющих домены между собой, делает их вполне автономными, переводит в ранг субъединиц, формирующих четвертичную структуру. Иногда в литературе используют термин "агрегат" как синоним понятия "четвертичная структура", с чем трудно согласиться, поскольку последнее подразумевает весьма высокий уровень организации — объединение субъединиц в молекулу, стабилизированную системой нековалентных взаимодействий. Точно так же нет оснований классифицировать, как четвертичную структуру надмолекулярные (например, мультиферментные) комплексы или протяженные структуры, такие, например, как оболочки фагов или белковые кристаллические тела включения в некоторых бациллах, хотя в механизме их образования немало общего с формированием четвертичной структуры.

Четвертичная структура — последний уровень в организации белковой молекулы, к тому же не обязательный — до половины известных белков ее не имеют. Граница между белками, имеющими четвертичную структуру и лишенными ее, не всегда вполне определена. Некоторые белки сравнительно легко диссоциируют на субъединицы уже, в которой одна из субъединиц (С — каталитическая) ответственна за собственно ферментную активность и катализирует перенос фосфата АТФ на белок, а другая является регуляторной (Е). В отсутствие циклического АМФ последняя связана с С-субъединицей в комплекс R—С и ингибирует ее. При образовании комплекса с цАМФ четвертичная структура распадается и С-субъединица оказывается способной фосфорилировать белковые субстраты. Ярким примером гетеромерного белка может служить РНК-полимераза. В гомомерных белках субъединицы одинаковы. С ними сходны и такие, строго говоря, гетеромерные белки, субъединицы которых не одинаковы, но достаточно сходны как по способу свертывания полипептидной цепи, так и функционально. Частоты, с которыми встречаются белки, построенные из двух, трех, четырех и т.д. субъединиц, весьма различны. Так, для более или менее случайной выборки из примерно 200 белков с молекулярной массой не более 300 кДа оказалось димеров 102, тетрамеров 58, гексамеров 23, тогда как тримеров только 9, пентамеров ни одного, октамеров 3. Таким образом, подавляющая часть белков, имеющих четвертичную структуру, приходится на димеры, тетрамеры и гексамеры, причем последние встречаются у белков с молекулярной массой, большей 100 кДа. Геометрия симметричных димеров очевидна. То же относится и к тримерам, которые весьма редки, однако встречаются в природе. В частности, они могут играть существенную роль при образовании трансмембранных каналов, поскольку своего рода пучок из трех субъединиц сам по себе образует внутренний канал. В тетрамерных белках субъединицы могут размещаться в вершинах квадрата, что встречается редко, или же занимать вершины тетраэдра. Последний тип четвертичной структуры, в котором каждая субъединица взаимодействует с тремя остальными с различной силой, а

молекула в целом оказывается весьма компактной, наблюдается особенно часто. Для гексамерных белков характерна октаэдрическая упаковка, гораздо реже встречаются плоские гексагональные структуры. Субъединицы, образующие симметричную четвертичную структуру, бывают идентичными, но могут и отличаться, будучи в то же время однотипными, эволюционно родственными белками, которые обладают одинаковым способом свертывания пептидной цепи в пространстве. В этих случаях формирование четвертичной структуры имеет характерные особенности. Если, например, тетрамерный белок образован структурно гомологичными однотипными субъединицами а и в то в зависимости от степени их отличия возможны две ситуации. Другие же наборы субъединиц нестабильны и практически не обнаруживаются. Типичным примером является лактатдегидрогеназа человека, построенная из четырех субъединиц. Последние могут быть двух типов: М- (от англ. muscle — мышечная) субъединица, преобладающая в гладких мышцах, и Н- (от англ. heart — сердечная) субъединица, преимущественно синтезируемая в сердечной мышце. Для лактатдегидрогеназы возможен следующий набор множественных форм: Н₄, МЗН₁, М₂Н₂, М₁Н₃, Н₄. Заметим, что множественные формы, различия между которыми обусловлены генетически, а не вызваны посттрансляционными модификациями или повреждением белка, принято называть изоформами. Разница в первичной структуре субъединиц отражается на соотношении катионных и анионных групп, что приводит к различиям в заряде изоформ и позволяет легко разделить их методом электрофореза. Такой анализ изоферментного состава лактатдегидрогеназы крови позволяет следить за поступлением в кровь лактатдегидрогеназы некоторых органов, в частности сердца при развитии соответствующей патологии, Например при некрозе сердечной мышцы. В последнем случае возрастет содержание изоформ, обогащенных Н-субъединицей. Этот подход нашел применение в медицинской диагностике и биохимической генетике.

Учитывая, что четвертичная структура не является обязательной для функционирования белка, очень много белков функционируют без наличия четвертичной структуры, но у четвертичной структуры есть определенные преимущества:

Увеличение активностей с одной компактной структуре, то есть это можно назвать возникновение четвертичной структуры необходимым механизмом эволюции доменов, когда домены окончательно становятся автономными и превращаются в отдельные субъединицы. Данные комплексы позволяют быстро осуществлять различные последовательности реакций метаболических процессов.

Возможность регуляции.

Взаимодействие с изменением активности. (**кооперативность изменения конформации протомеров**)

Для отдельных субъединиц олигомерных белков и белковой глобулы в целом также характерны кооперативные изменения конформации. Рассмотрим это на

примере гемопroteинов гемоглобина и миоглобина. Миоглобин - мономерный белок, гемоглобин - состоит из 4 протомеров двух типов. Первичная структура протомеров гемоглобина типов α и β отличается примерно на половину остатков (из 141 и 147 соответственно). Еще сильнее отличается первичная структура миоглобина. В то же время вторичная и третичная структуры протомеров гемоглобина и миоглобина очень сходны, они выполняют сходные функции, в основе которых лежит способность обратимо связывать кислород. Простетическая группа этих белков - гем - представляет собой плоскую молекулу, содержащую 4 пиррольных кольца и соединенный с ними атом железа.

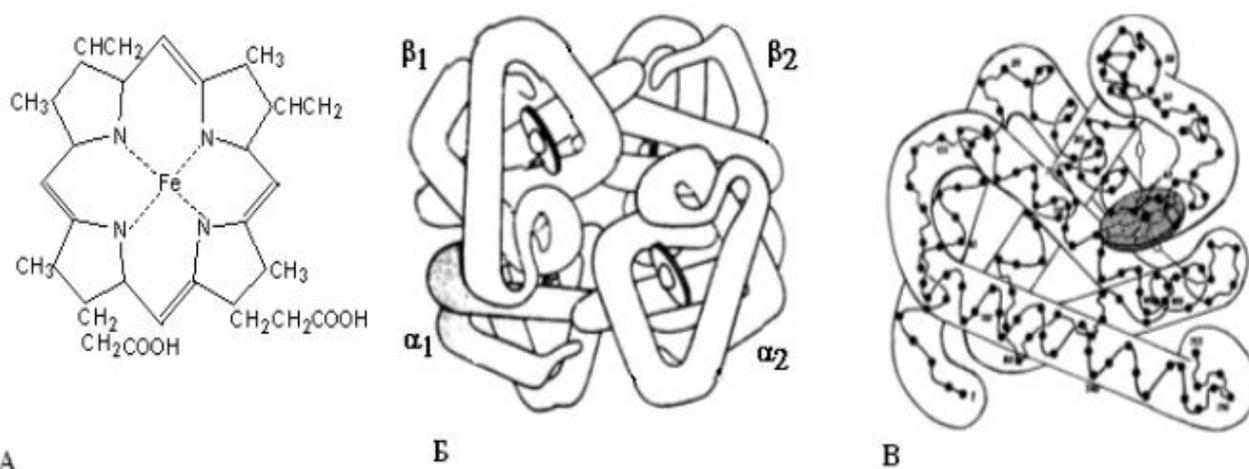
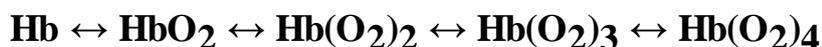


Рисунок 53: А - структура гема; Б - четвертичная структура гемоглобина; В - третичная структура миоглобина

Гем соединяется с белковой частью (глобином) гидрофобными связями между пиррольными циклами и гидрофобными радикалами аминокислот. Кроме того, имеется координационная связь между атомом железа и имидазольным кольцом одного из остатков гистидина в глобине. За счет еще одной координационной связи к атому железа может присоединяться молекула кислорода с образованием оксигемоглобина или оксимиоглобина. Валентность железа при этом не изменяется.

Пиррольные кольца гема находятся в одной плоскости, в то время как атом железа выступает из этой плоскости. Присоединение кислорода “выпрямляет” молекулу гема: железо перемещается в плоскость пиррольных колец. Поскольку железо связано с остатком гистидина глобина, происходит перемещение участка цепи, то есть изменение конформации белка. Для миоглобина изменение конформации ограничивается единственной полипептидной цепью. В гемоглобине же имеется четыре протомера, каждый из которых содержит гем и может присоединять кислород:



Первая молекула кислорода изменяет конформацию протомера, к которому она присоединилась. Поскольку этот протимер соединен с тремя

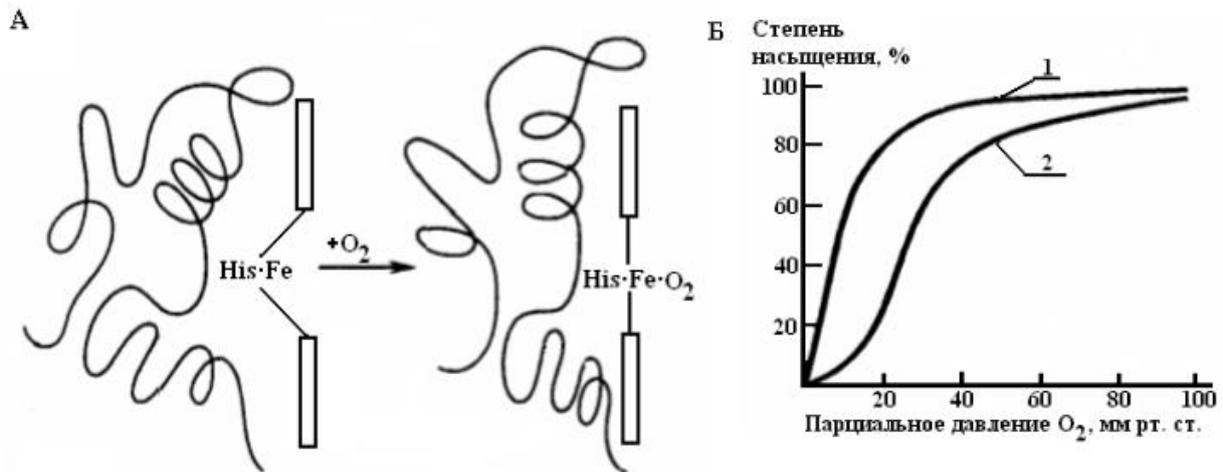


Рисунок 54: Кооперативное взаимодействие протеомеров. А- механизм связывания кислорода гемом; Б – график насыщения гемоглобина миоглобина в зависимости от парциального давления кислорода остальными, изменяется конформация и других протомеров. Это явление называют **кооперативностью изменения конформации протомеров**. Следствием изменения конформации после присоединения первой молекулы кислорода является увеличение сродства трех остальных протомеров к кислороду. Присоединение второй молекулы еще сильнее облегчает присоединение кислорода к оставшимся двум свободным гемам. Сродство гемоглобина к четвертой молекуле кислорода примерно в 300 раз больше, чем к первой. Вследствие этого график зависимости насыщения гемоглобина кислородом от парциального давления кислорода представляет собой не гиперболу, как в случае насыщения миоглобина, а S-образную кривую. Гемоглобин присоединяет кислород из альвеолярного воздуха, где парциальное давление близко к 100 мм рт.ст., здесь насыщенность гемоглобина близка к 100%. Отдается кислород при парциальном давлении около 40 мм рт.ст., здесь насыщенность гемоглобина кислородом близка к 75%. Далее цикл повторяется. Из представленных кривых видно, что миоглобин не смог бы справиться с задачей: при обоих парциальных давлениях насыщенность белка к кислороду близка к 100%. Функция миоглобина - промежуточное звено транспорта кислорода к митохондриям (основным потребителям кислорода) и создание в мышцах некоторого запаса кислорода (главным образом имеет значение для ныряющих животных). Кооперативные изменения конформации протомеров - важнейший механизм регуляции, в частности для аллостерических ферментов. Кстати, на этом же примере отметим еще две особенности. Гем в составе гемоглобина и миоглобина обладает способностью высокоспецифично присоединять молекулу кислорода. Эта специфичность обусловлена отличным от структурной комплементарности механизмом, зависящим в основном от реакционной способности атома железа. Однако и в этом случае специфичность определяется влиянием полипептида. Гем в составе других гемопротеинов -

цитохромов - не способен присоединять кислород и служит переносчиком электронов. В процессе принятия и передачи электрона валентность железа гема цитохромов меняется. Вторая особенность. Протомеры дезоксигемоглобина могут избирательно связываться с 2,3-дифосфоглицератом, содержащимся в эритроцитах, причем участок связывания дифосфоглицерата отличен от участка связывания кислорода. Дифосфоглицерат несет 5 отрицательных зарядов, распределенных между 5 атомами кислорода. Его молекула оказывается во впадине, образованной двумя β -субъединицами, где она взаимодействует сразу с 7 катионными группами этих цепей (α -аминогруппы Val-1, имидазольные кольца His-2 и His-143 обеих цепей и аминогруппа Lis-82 одной из цепей). Вследствие связывания происходит стабилизация дезоксиформы и снижение сродства к кислороду. В отсутствие дифосфоглицерата HbA насыщается кислородом на 50% при его парциальном давлении 12 мм рт. ст., в присутствии - при 50 мм рт. ст. Это типичный пример так называемого **аллостерического** (“другое место”) механизма регуляции активности белков. Возможность воздействия эффектора на структурно удаленный функциональный центр белка основана на способности четвертичной структуры отвечать на относительно слабые воздействия. Природа приспособилась подстраивать рассмотренный механизм к конкретным условиям существования организмов. У высокогорных лам, живущих в условиях дефицита кислорода His-2 заменен на аспарагин, не несущий положительного заряда. В фетальном гемоглобине His-143 заменен на серин. В обоих случаях результатом является меньшее сродство к дифосфоглицерату и, как следствие, большее сродство гемоглобина к кислороду. В первом случае это позволяет достигать нужного насыщения крови кислородом в условиях разреженного воздуха, во втором – «отбирать» плоду кислород из крови матери. С олигомерными белками сходны белки доменного строения. Они также содержат в значительной мере обособленные глобулы - домены, однако эти глобулы образованы одной и той же полипептидной цепью. Пептидных перемычек между доменами может быть и две. Изложенные представления позволяют понять механизм точечных мутаций. Точечные мутации предполагают замену одного нуклеотида гена на другой с изменением кода и, следовательно, с заменой одной из аминокислот полипептида. Последствия этой замены могут быть самыми разными и зависят от:

1. Различий свойств R-групп (гидрофобность, заряд, размер, жесткость цепи, способности образовывать водородные или дисульфидные связи). В зависимости от этого может произойти (а может и не произойти) существенное изменение вторичной, третичной или четвертичной структуры.

2. “Ответственности” участка цепи, в котором произошла замена аминокислоты, - наиболее критическими являются активный центр и точки перегибов.

Замена только одной аминокислоты в 6-м положении полипептидной последовательности гемоглобина (глутамата на валин) приводит к тяжелому

заболеванию - серповидноклеточной анемии. На поверхности глобулы появляется “липкий” гидрофобный участок, в результате дезоксигемоглобин А слипается и образует аномально длинные нитевидные агрегаты, которые и обуславливают серповидную форму эритроцитов. Физические характеристики белка как полимера полностью определяются его способностью формировать компактную глобулу, от особенностей которой зависит и олигомеризация многих белков. Химические и функциональные свойства белков зависят от специфических взаимодействий функциональных групп, сближенных в его пространственной структуре. Вследствие этого поведение этих групп коренным образом отличается от их реакционной способности в аминокислотах и небольших пептидах. Белок может функционировать, то есть выступать в роли фермента, структурного или транспортного белка, регулятора, токсина, ингибитора только потому, что он обладает вполне определенным пространственным строением молекулы гидрофобных радикалов.

Изобелки.

Как описано выше гомологичные белки — это белки выполняющие одинаковую функцию у разных организмов. Если несколько форм одного белка присутствуют в одном организме и/или у представителя одного вида, то их называют **изофункциональными белками** или **изобелками**. Так, у взрослого человека в крови содержится 96% HbA и по 2% HbF и HbA₂. Все являются тетрамерами, протомеры представлены 4 формами: α, β, γ и Δ. Структура перечисленных видов гемоглобинов соответственно: α₂β₂, α₂γ₂ и α₂Δ₂. Очень мало отличаются по первичной, вторичной и третичной структурам, выполняют одну функцию, однако отличаются по сродству к кислороду. HbF имеет большее сродство к кислороду по сравнению с HbA и может отнимать кислород от HbA:



HbF характерен для эмбриональной стадии развития человека. Существование этих двух изобелков позволяет переносить кислород к эмбриону из крови матери в условиях несвязанных между собой кровеносных систем. Изобелки и гомологичные белки - разные понятия, гомологичные белки принадлежат организмам разных видов.

Множественность форм белков возникает в силу ряда причин, которые можно разделить на две категории. К первой относятся причины генетического уровня: в организме имеются множественные гены, каждый из которых кодирует свою субъединицу олигомерного белка. Ко второй категории относятся причины постраницационного уровня; в этом случае различия между субъединицами, кодируемые одним геном, возникают из-за различных модификаций исходно гомогенных единиц. В свою очередь имеются два вида множественности генов: 1) множественные аллели в одном локусе, 2) множественные генные локусы.

В диплоидном геноме каждый генный локус дублирован. В отношении каждого локуса особь может быть гомозиготной, т.е. обладающей разными аллелями. Если данный локус кодирует какую-то субъединицу фермента, то у гомозиготных особей синтезируются субъединицы только одного типа. Соответственно у гетерозиготных особей должны синтезироваться субъединицы двух разных типов. Понятно, что у отдельной особи множественность аллелей не может обеспечить большое разнообразие форм белков, поскольку число аллелей в диплоидном локусе не превышает двух. Однако в генофонде в целом число аллелей может быть достаточно велико, и поэтому при сравнении различных особей вероятно значительная вариабельность типов ферментных единиц. Различия между субъединицами, кодируемыми различными аллелями одного гена, обычно невелики; так возможны замены отдельных аминокислот, обусловленные точечными мутациями в нуклеотидных последовательностях ДНК. Если генный локус активен, то, как правило, функционируют оба аллеля. Вследствие этого, несмотря на большие колебания общей активности фермента в зависимости от вида клетки, у каждой особи изоферментный профиль остается постоянным: у гомозиготных особей субъединицы всегда одного типа, а у гетерозиготных – двух. Многие белки кодируются не одним, а несколькими генами, в этом случае каждому локусу будет соответствовать своя субъединица фермента. Поскольку экспрессия каждого генного локуса регулируется независимо, в одних клетках организма могут синтезироваться субъединицы одного типа, а в других – другого. Более того, экспрессия генных локусов нередко меняется в процессе развития организма, и соответственно меняются типы субъединиц, образующихся в ткани. Таким образом, благодаря множественности генных локусов возможно изменение изоферментного профиля от ткани к ткани, а также в одной и той же ткани по мере роста и развития. Такое изменение изоферментного профиля невозможно, если возникновение изоформ обусловлено наличием различных аллелей в одном локусе. Поскольку все особи одного вида имеют одни и те же генные локусы, множество кодирующих белки локусов при отсутствии множественности аллелей не могла бы обеспечить различий в изоферментном спектре между отдельными особями вида. Субъединицы белков, соответствующих разным локусам, как правило, сильно отличаются друг от друга (множественные замены аминокислот, делеции, вставки), что может отражаться в размерах субъединиц. Чтобы понять, каким образом на основе двоякой множественности генов возникают изобелки. Вернемся к примеру гемоглобина человека. Он существует в виде нескольких хорошо изученных молекулярных форм, которые образуются в результате множественности как генных локусов, так и аллелей. Гемоглобин кодируется восемью различными генными локусами, каждый из которых определяет образование своей субъединицы. Полипептидные последовательности субъединиц очень похожи, хотя много замен аминокислот. Так, в α - и β -субъединицах различаются примерно 50% аминокислотных остатков, кроме того, несколько различна длина полипептидов (в α -субъединице – 141 остаток, в β -, γ - и δ -субъединицах – 146). По мере развития организма от раннего

эмбрионального периода до детского возраста состав гемоглобинов качественно изменяется, что связано с изменением активности отдельных генных локусов. Так, гемоглобин новорожденного имеет состав $\alpha_2\gamma_2$, но спустя несколько месяцев он замещается гемоглобином $\alpha_2\beta_2$, так как активируется локус β вместо локуса γ . Существуют и необычные гемоглобины, обусловленные наличием редких аллелей, причем их список постоянно растет. Наиболее распространен и изучен ген серповидноклеточной анемии, Он представляет собой аллель локуса гемоглобина β . Кодированный им полипептид отличается от нормальной β -цепи только одной аминокислотой, а именно в нем в 6-м положении вместо глутамата стоит валин. Даже в тех районах земного шара, где часто встречается ген серповидноклеточной анемии, профили гемоглобинов у отдельных лиц различаются в зависимости от того, гомозиготны ли эти лица по нормальному аллелю, по гену серповидноклеточной анемии или же гетерозиготны. Синтезирующиеся в организме белки могут подвергаться модификациям: присоединению углеводов, ограниченному протеолизу или ковалентной модификации боковых групп аминокислот. Если посттрансляционным модификациям подвергается не вся популяция субъединиц, а только ее часть, то в организме будут присутствовать и модифицированные и немодифицированные субъединицы, то есть возникают изоферменты. примером может служить микрогетерогенность мышечной альдолазы. У позвоночных альдолаза кодируется тремя генными локусами, и хотя в мышцах проявляет активность один локус А, из этой ткани можно выделить субъединицы двух типов: $A\alpha$ и $A\beta$. Оказалось, что собственно продуктом трансляции является полипептид $A\alpha$, но он медленно превращается в $A\beta$ вследствие того, что дезаминируется остаток аспарагина вблизи карбоксильного конца цепи. Когда процессы посттрансляционной модификации в одних тканях намного активнее, чем в других, возникает тканеспецифичное распределение вторичных изоферментов, внешне сходное с эффектом множественности генных локусов. Рассмотрим субъединицы пируваткиназы. У млекопитающих субъединицы этого фермента бывают трех основных типов, каждый из которых отвечает независимому генному локусу. Субъединицы типа L (обозначаемые также тип I) есть в печени и в эритроцитах, однако изоферменты типа L из этих двух источников несколько различаются по величине и электрофоретической подвижности. Первоначально предполагалось, что синтез несколько большей по размеру субъединицы типа L', присутствующий в эритроцитах, обусловлен четвертым генным локусом. Однако впоследствии выяснилось, что дело в посттрансляционной модификации. Во всех тканях первичным продуктом генного локуса L является субъединица типа L', но в печени они быстро расщепляются протеолитическими ферментами с образованием субъединиц типа L. В эритроцитах этот процесс идет медленнее. Пируваткиназа играет важную роль в регуляции гликолиза, а субъединицы типов L и L' отличаются по своим регуляторным свойствам, что имеет, по-видимому, определенный физиологический смысл. Предложено термин «изофермент» употреблять

только в отношении множественности форм, обусловленной генетическими причинами, и не применять в тех случаях, когда она обусловлена посттрансляционными модификациями. Многие ферменты существуют в виде олигомеров, состоящих из нескольких субъединиц; очень часто встречаются димеры и тримеры. Если в клетке имеются субъединицы двух или нескольких типов и разные субъединицы способны соединяться друг с другом в любых комбинациях, то возникает целый набор изоферментов. В рассмотренных примерах образование изоформ обусловлено наличием 2 генных локусов. Если же в клетках присутствуют субъединицы не двух, а большего числа типов, то сложность набора изобелков возрастает. Так, например, у большинства видов позвоночных имеются субъединицы лактатдегидрогеназы трех типов – А, В и С; при случайной комбинации их в тетрамеры может образоваться 15 изоферментов, из них 12 гибридных. Сложность еще больше возрастает, если к множеству локусов добавятся аллельные вариации. Так, в случае лактатдегидрогеназы позвоночных обнаружены варианты аллелей, кодирующих субъединицы А и В. В организме, гетерозиготном по этим вариантам, будут синтезироваться пять различных субъединиц лактатдегидрогеназы: А, А', В, В' и С. Следовательно, возможно образование 70 тетрамерных изоферментов. К счастью для исследователя, сложность наборов изоферментов нередко оказывается ограниченной: реально образуются отнюдь не все возможные гибридные варианты. Чаще всего это происходит потому, что в клетке одновременно функционируют не все генные локусы, экспрессия некоторых генов крайне ограничена. Так, С-субъединица лактатдегидрогеназы синтезируется только в первичных сперматоцитах, где не обнаружено субъединиц А и В. Вследствие такого разделения *in vivo* не встречаются гибридные изоферменты, содержащие С-субъединицу.

Ферменты

Катализаторы — это вещества, ускоряющие химические реакции; в ходе реакции они претерпевают физические изменения, но по ее завершении возвращаются в исходное состояние. Большая часть ферментов является **белками**. Существуют **рибозимы** – ферменты, являющиеся молекулами **РНК**. К рибозимам относится РНК большой субъединицы рибосомы, осуществляющий биосинтез белка, РНКаза Р (англ.), осуществляющая разрезание предшественников тРНК, и интроны автосплайсинга митохондриях некоторых ифузорий.

В отличие от небелковых катализаторов (H^+ , OH^- , ионы металлов) каждый фермент способен катализировать лишь очень небольшое число реакций, часто только одну. Таким образом, ферменты представляют собой **реакционно-специфические** катализаторы. **Практически все биохимические реакции катализируются ферментами.**

Классификация ферментов и их номенклатура

Первоначально ферментам давали названия, образуемые путем добавления окончания -аза к названию субстрата, на который данный фермент действует. Так, ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы амилазами; ферменты, гидролизующие жиры (липос), — липазами; ферменты, гидролизующие белки (протеины), протеиназами. Позднее ферментам, катализирующим сходные по типу реакции, стали давать название, указывающее тип соответствующей реакции — дегидрогеназы, оксидазы, декарбоксилазы, ацилазы и т.д. Многие из этих названий используются и теперь. Номенклатура, введенная **Международным биохимическим союзом (IUB)**, на первый взгляд кажется сложной и громоздкой, но зато она является однозначной. Главный ее принцип состоит в том, что ферменты называют и классифицируют в соответствии с типом катализируемой химической реакции и ее механизмом; это существенно облегчает систематизацию данных, относящихся к различным аспектам метаболизма. Основные черты системы, введенной **IUB**, состоят в следующем.

1. Реакции и ферменты, которые их катализируют, подразделяются на шесть классов, в каждом из которых имеется несколько подклассов (от четырех до 13).

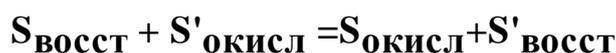
2. Название фермента состоит из двух частей: первая часть — название субстрата (или субстратов); вторая указывает **тип катализируемой реакции** и оканчивается на **-аза**.

3. Дополнительная информация, если она необходима для уточнения, заключается в скобки. Например, фермент, катализирующий реакцию $L\text{-малат} + \text{NAD}^+ = \text{Пируват} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$, имеет номер 1.1.1.37 и называется L-малат: NAD^+ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

4. Каждый фермент имеет кодовый номер по классификации ферментов (КФ): первая цифра характеризует класс реакции, вторая — подкласс и третья — подподкласс. Четвертая цифра указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Таким образом, КФ 2.7.1.1 означает, что фермент относится к классу 2 (трансфераза), подклассу 7 (перенос фосфата) и подподклассу 1 (акцептором фосфата является спирт). Последняя цифра обозначает фермент гексокиназу, или АТФ: D-гексозо-6-фосфотрансферазу т.е. фермент, катализирующий перенос фосфата с АТФ на гидроксильную группу атома углерода в шестом положении глюкозы. Ниже представлены все шесть классов ферментов и некоторые конкретные примеры. В скобках указано рекомендуемое название.

Ферменты делятся на шесть классов в соответствии с типом катализируемой реакции:

1. Оксидоредуктазы. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов, S и S':



Катализируют реакции, в которых участвуют такие группы, как CH—OH , CH—CH , C = O , CH—NH_2 и —CH—NH— . Некоторые подклассы:

1.1. Ферменты, действующие на группу CH—OH (донор электронов).
Например:

1.1.1.1. Алкоголь: NAD^+ оксидоредуктаза [алкогольдегидрогеназа]

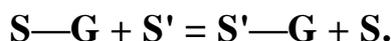
Спирт + NAD^+ = Альдегид или кетон + $\text{NADH} + \text{H}^+$.

1.4. Ферменты, действующие на группу CH—NH_2 (донор электронов).
Например:

1.4.1.3. L-Глутамат: NAD(P)^+ оксидоредуктаза (дезаминирующая) [глутаматдегидрогеназа из печени животных]. Запись NAD(P)^+ означает, что акцептором электронов может служить либо NAD^+ , либо NADP^+ .

L-Глутамат + $\text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+ = \alpha\text{-Кетоглутарат} + \text{NH}_4^+ + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$.

2. Трансферазы. Ферменты, катализирующие перенос группы G (отличной от атома водорода) с субстрата S на субстрат S':



Катализируют перенос одноуглеродных групп, альдегидных или кетонных остатков, а также ацильных, алкильных, гликозильных групп и групп, содержащих фосфор и серу. Некоторые подклассы:

2.3. Ацилтрансферазы. Например:

2.3.1.6. Ацетил-СоА: холин О-ацетилтрансфераза [холин-ацетилтрансфераза]

Ацетил-СоА + Холин = СоА + О-Ацетилхолин.

2.7. Ферменты, катализирующие перенос группы, содержащей фосфор.
Например:

2.7.1.1. АТФ: D-гексоза 6-фосфотрансфераза [гексокиназа]

АТФ + D-Гексоза = АДФ + D-Гексозо-6-фосфат.

3. Гидролазы. Ферменты, катализирующие гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозидных связей, кислотных ангидридов, связей C—C , C-галоида и P—N .



Например:

3.1. Ферменты, действующие на сложноэфирные связи. Например: 3.1.1.8. Ацилхолин—ацилгидролаза [псевдохолинэстераза]

Ацилхолин + $\text{H}_2\text{O} = \text{Холин} + \text{Кислота}$.

3.2. Ферменты, действующие на гликозидные соединения. Например:

3.2.1.23. β -D-Галактозид—галактогидролаза [β -галактозидаза]

β -D-Галактозид + H_2O = Спирт + D-Галактоза.

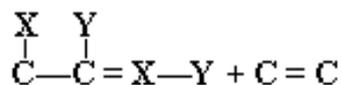
3.4. Ферменты, действующие на пептидные связи.

Классификация (с подразделением на 11 подклассов) учитывает различия между пептидазами и протеазами, выделяет ферменты, гидролизующие дипептиды или более крупные пептиды, отщепляющие одну или большее число аминокислот, атакующие связь на С- или N-конце. Протеиназы в соответствии с механизмом катализа подразделяются на сериновые, тиоловые и металлозависимые. Например:

3.4.21. Сериновые протеиназы. Например: Химотрипсин, трипсин, плазмин, факторы свертывания крови IXa и XIa.

3.4.23. Карбоксильные (кислые) протеиназы. Например, пепсины А, В и С.

4. Лиазы. Ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому механизму, с образованием двойных связей.



Ферменты, действующие на связи С—С, С—О, С—N, С—S и С—галоид. Некоторые подгруппы:

4.1.2. Альдегид-лиазы. Например:

4.1.2.7. Кетозо-1-фосфат-альдолаза [альдолаза]

Кетозо-1-фосфат = Дигидроксиацетонфосфат + Альдегид.

4.2. Углерод—кислород лиазы. Например:

4.2.1.2. L-малат—гидролиаза [фумараза]

L-малат = Фумарат + H_2O .

5. Изомеразы. В этот класс включены все ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и позиционных изомеров.



Некоторые подклассы:

5.2. Цистранс-изомеразы. Например:

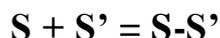
5.2.1.3 11-цис-транс-изомераза [ретиальизомераза]

5.3. Ферменты, катализирующие взаимопревращение альдоз и кетоз. Например:

5.3.1.1. D-Глицеральдегид-3-фосфаткетол-изомераза [триозофосфатизомераза]

D-Глицеральдегид-3-фосфат = Дигидроксиацетонфосфат.

6. Лигазы. (от лат. **лигаре**—связывать). Ферменты, катализирующие соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или подобного соединения. В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции, в ходе которых образуются связи С—О, С—S, С—N и С—С.



Некоторые подклассы:

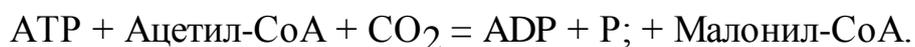
6.3. Ферменты, катализирующие образование связей С—N. Например:

6.3.1.2. L-Глутамат:аммиак лигаза (ADP) [глутаминсинтетаза]



6.4. Ферменты, катализирующие образование связей С—С. Например:

6.4.1.2. Ацетил-СоА:CO₂ лигаза (ADP) [ацетил-Со А—карбоксилаза]



Коферменты

Холофермент – полностью функциональная молекула фермента

Апофермент – белковая часть фермента

Кофермент – специфическое термостабильное низкомолекулярное органическое соединение. По сути являющееся постоянно связанным с каталитическим центром вторым субстратом.

Если фермент простой белок, то холофермент = апофермент.

Если фермент сложный белок, холофермент = апофермент + кофермент

причинам. Во-первых, в ходе реакции **кофермент претерпевает химические изменения, в точности противоположные изменениям, которые происходят в субстрате.** Например, в окислительно-восстановительных дегидрогеназных реакциях молекула субстрата окисляется, а молекула кофермента восстанавливается. Подобным же образом в реакциях переаминирования пиридоксальфосфат выступает как второй субстрат в двух сочетанных реакциях и как переносчик аминогруппы между различными α-амино- и α-кетокислотами.

Вторая причина, по которой кофермент можно считать равноправным участником реакции, заключается в том, что именно его участие может иметь фундаментальное физиологическое значение. Например, работа мышцы в анаэробных условиях сопровождается превращением пирувата в лактат. Но в этом случае важны совсем не лактат и не пируват: предназначением реакции является превращение NADH в NAD⁺. В отсутствие NAD⁺ гликолиз продолжаться не может и анаэробный синтез АТФ (а, следовательно, и работа мышцы) прекращается. Восстановление пирувата до лактата в анаэробных условиях обеспечивает окисление NADH в NAD⁺, необходимый для синтеза АТФ. Функцию образования NAD⁺ могут выполнять и другие реакции.

Значение этого процесса становится очевидным, если перейти от животных к другим формам жизни. У бактерий и дрожжей, растущих в анаэробных условиях, вещества, образующиеся из пирувата, служат окислителями для NADH, при этом сами они восстанавливаются.

Кофермент может быть связан с апоферментом ковалентными или нековалентными связями. Термин «простетическая группа» относится к ковалентно связанному коферменту. К числу реакций, требующих присутствия коферментов, относятся окислительно-восстановительные реакции, реакции переноса групп и изомеризации, а также реакции конденсации (по системе IUB это классы 1, 2, 5 и 6). Реакции расщепления, например гидролитические реакции, катализируемые пищеварительными ферментами, протекают в отсутствие кофермента.

Можно предложить следующую классификацию коферментов:

Коферменты, участвующие в переносе любых групп, кроме атомов водорода:	Коферменты, участвующие в переносе атомов водорода:
Сахарофосфаты	NAD ⁺ , NADP ⁺
CoASH	FMN, FAD
Тиаминпирофосфат	Липоевая кислота
Пиридоксальфосфат	Кофермент Q
Фолиатные коферменты	
Биотин	
Кобамидные (B ₁₂) коферменты	
Липоевая кислота	

Механизмы действия ферментов

Как и любой катализатор, ферменты понижают энергию перехода. В обоих случаях величина свободной энергии образования переходного состояния характеризует энергетический барьер полной реакции. Но энергетический барьер реакции, проходящей через переходное состояние [Y-R-•X], ниже, чем энергетический барьер реакции, проходящей через переходное состояние [Y-R-X]. В приведенном выше примере [Y-R-X] представляет собой переходное состояние **некатализируемой** реакции, тогда как [Y-R-X]^b — это переходное состояние **катализируемой** реакции. Все катализаторы, включая и ферменты, **уменьшают свободную энергию образования переходного состояния ΔG_0** . Заметим далее, что на величину ΔG_0 катализатор не влияет: **изменение свободной энергии полной реакции не зависит от присутствия**

катализаторов. Константа равновесия химической реакции является функцией изменения стандартной свободной энергии этой реакции: $\Delta G_0 = -RT \ln K_{eq}$.

Отсюда следует, что **ферменты и другие катализаторы не влияют на константу равновесия реакции.**

Кинетическая теория, или теория столкновений,

Кинетическая теория, или теория столкновений, основывается на двух ключевых положениях.

1. Для протекания реакции молекулы должны сталкиваться друг с другом, т.е. сближаться на расстояния, достаточные для образования связей.

2. Чтобы столкновение было продуктивным (т.е. приводило к протеканию реакции), реагирующие молекулы должны обладать энергией, достаточной для преодоления энергетического барьера.

Отсюда следует, что при наличии у реагирующих молекул достаточной энергии все факторы, повышающие частоту их столкновений, будут повышать скорость реакции. И наоборот, факторы, понижающие частоту столкновений молекул или их кинетическую энергию, снижают скорость реакции.

Если не все молекулы в популяции обладают энергией, достаточной для осуществления реакции, то повышение температуры, сопровождающееся увеличением кинетической энергии молекул, приведет к повышению скорости реакции. В случае *A* ни одна из молекул, в случае *B*—часть, а в случае *B*—все молекулы обладают кинетической энергией, достаточной для преодоления энергетического барьера. В отсутствие ферментов многие химические реакции при температуре, характерной для живых клеток, идут исключительно медленно. Однако даже и при этой температуре молекулы находятся в движении и сталкиваются друг с другом. Правда, **они не могут реагировать быстро, поскольку большинство из них не обладает достаточной кинетической энергией для преодоления энергетического барьера.** При достаточно большом повышении температуры (т.е. при повышении кинетической энергии) реакция пойдет быстрее. То, что реакция вообще идет (т.е. протекает самопроизвольно), следует из условия $\Delta G_0 < 0$, но при низких температурах она идет медленно. **Ферменты ускоряют реакции, протекающие самопроизвольно при условиях, преобладающих в живых клетках.**

Такое ее представление подчеркивает три важных признака ферментативных реакций переноса групп.

1. Каждая полуреакция сопровождается и разрывом, и образованием ковалентной связи.

2. Фермент является равноправным реагентом, таким же, как $D \rightarrow G$ и A .

3. В то время как в полной реакции фермент выполняет функцию катализатора (т.е. он требуется лишь в следовых количествах и возвращается в исходное

состояние по окончании реакции), в каждой из полуреакций фермент выступает как стехиометрический реагент (т. е. реагирует с другими реагентами в молярном отношении 1:1). Многие другие биохимические реакции можно рассматривать как частные случаи реакций переноса, в которых отсутствуют либо А, либо D, либо оба реагента. Так, реакцию изомеризации (например, взаимопревращение глюкозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата) можно представить как реакцию переноса, в которой отсутствуют D и А.

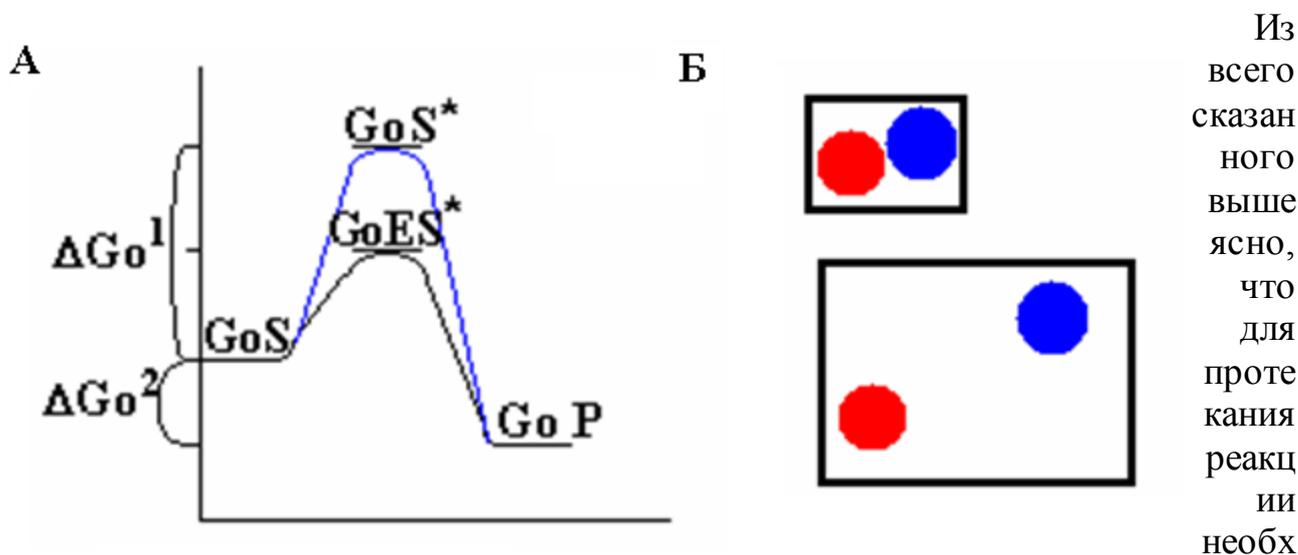


Рисунок 55: Механизм действия ферментов. А - график изменения энергии в ходе химической реакции, Б - локальное изменение концентрации в ходе работы ферментов

Из
всего
сказан
ного
выше
ясно,
что
для
проте
кания
реакц
ии
необх
одимо
,
чтобы

все участвующие в ней реагенты сближались на расстояния, достаточные для образования (или для разрыва) связей, т. е. сталкивались друг с другом. В химии гомогенных растворов концентрация реагирующих молекул в отсутствие катализаторов считается постоянной во всем растворе. Однако в присутствии катализатора это условие перестает соблюдаться. Для эффективной работы катализатор должен иметь на своей поверхности участки связывания реагирующих молекул. Такое связывание представляет собой обратимый процесс, однако равновесие сильно сдвинуто в сторону образования комплекса. Качественно это можно представить следующим образом:

Реагент + Катализатор = Комплекс реагента с катализатором.

Прочность комплекса реагента **R** и катализатора **C** можно охарактеризовать количественно с помощью константы диссоциации комплекса $R - C$ (K_d). Отсюда мы получаем одно важное следствие: **связывание реагента с катализатором приводит к заметному повышению локальной концентрации реагента по сравнению с его концентрацией во всем растворе.**

Если катализатор биомолекулярной реакции (идущей с участием двух реагентов) связывает оба реагента, то локальная концентрация каждого из них повышается, причем степень этого повышения зависит от сродства катализатора к данному реагенту (K_d). Одним из ключевых факторов,

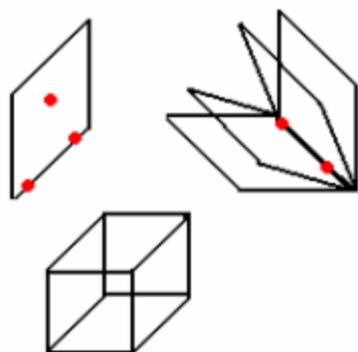
позволяющих ферменту служить катализатором, является его способность эффективно связывать один или (чаще) оба реактанта, участвующие в бимолекулярной реакции, что приводит к повышению локальной концентрации реактантов и, следовательно, к локальному повышению скорости реакции. То обстоятельство, что ферменты по сравнению с большинством небелковых катализаторов необычайно эффективны и высокоизбирательны, требует дальнейшего объяснения. Чтобы понять эти отличительные свойства ферментов, мы должны ввести понятие активного, или каталитического, центра.

Каталитический центр

Размеры белков намного превышают размеры низкомолекулярных субстратов, в связи с чем возникло представление о том, что в катализе участвует лишь ограниченная область молекулы фермента. Эту область мы и называем **каталитическим центром**. Вначале было непонятно, почему молекулы ферментов столь велики, если только часть их структуры участвует в связывании субстрата и непосредственно в катализе. Однако, как показал анализ трехмерной структуры ферментов, с субстратом взаимодействует намного большая часть белковой молекулы, чем предполагалось ранее. Если еще учесть включение в работу ферментов аллостерических центров такого же размера не приходится удивляться объемности ферментов.

Связь фермента с субстратом

Большинство субстратов образует, по меньшей мере, три связи с ферментом. Благодаря такой «**трехточечной фиксации**» симметричная молекула может



проявлять асимметрию. Чтобы это пояснить, представим область фермента, связывающую субстрат, как участок плоской поверхности (хотя, как мы вскоре увидим, субстратсвязывающая «площадка» фермента редко бывает плоской, а возможно, и не бывает совсем). Если молекула субстрата может

подойти к этому участку только с одной стороны, и взаимодействовать могут только комплементарные структуры субстрата и фермента (в реальных ферментах оба этих условия соблюдаются), то молекула субстрата может связываться с ферментом единственным способом, даже если группы 1 и 3

Рисунок 56:

Механизм

связывания минимум

в трех точках

идентичны. Перебирая мысленно все возможные пространственные ориентации молекулы субстрата,

можно убедиться, что с тремя точками плоской поверхности (с одной и той же стороны) молекула может связаться только в одной ориентации. Отсюда следует, что группы 1 и 3, хотя они и идентичны, при связывании с ферментом становятся неэквивалентными из-за различия в их окружении. Химические изменения будут происходить только с группой 1, но не с группой 3 (или

наоборот). Обобщая эти рассуждения, можно объяснить теперь, почему ферментативное восстановление оптически неактивного пирувата приводит к образованию именно L-, а не D, L-лактата. Именно такой способ присоединения обеспечивает специфичность фермента.

Специфичность ферментов

Специфичность ферментов – это способность фермента катализировать одну и только одну специфическую реакцию является, пожалуй, наиболее важным его свойством. Благодаря этому скорости специфических метаболических процессов могут регулироваться путем изменения каталитической активности специфических ферментов. Правда, многие ферменты катализируют реакции одного типа (перенос фосфата, окислительно-восстановительные реакции и т.д.), субстратами при этом является небольшое число структурно сходных соединений. Реакции с альтернативными субстратами происходят в тех случаях, когда эти субстраты присутствуют в высоких концентрациях. Протекают ли в живых организмах все реакции, возможные при участии данного фермента, зависит от относительной концентрации альтернативных субстратов в клетке и относительного сродства фермента к этим субстратам.

Оптическая специфичность ферментов

За исключением эпимераз (рацемаз), которые катализируют взаимопревращение оптических изомеров, **ферменты в общем случае проявляют абсолютную оптическую специфичность, по крайней мере, по отношению к одному из участков молекулы субстрата.** Так, ферменты гликолитического и прямого окислительного пути катализируют превращения только D-, но не L-фосфосахаров. За единичными исключениями (например, почечная оксидаза D-аминокислот) большинство ферментов млекопитающих катализирует превращение только L-изомеров аминокислот.

Оптическая специфичность может относиться как к фрагменту молекулы, так и к молекуле в целом. Иллюстрацией служит специфичность гликозидаз. Эти ферменты катализируют гидролиз гликозидных связей между сахаром и спиртовой группой: они высоко-специфичны как к сахарному фрагменту, так и к характеру гликозидной связи (α или β), но относительно неспецифичны к спиртовому фрагменту молекулы.

Группоспецифичность ферментов

Литические ферменты действуют на специфические химические группировки: гликозидазы — на гликозидные связи, пепсин и трипсин — на пептидные связи. Действие этих ферментов распространяется на большое число субстратов, что позволяет организму обойтись небольшим числом пищеварительных ферментов — иначе их потребовалось бы намного больше.

Отдельные литические ферменты отличаются более высокой группоспецифичностью. Так, химотрипсин гидролизует преимущественно пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит ароматическим аминокислотам — фенилаланину, тирозину или триптофану. Карбоксипептидазы и аминопептидазы отщепляют аминокислоты по одной с карбоксильного или с amino-конца соответственно.

Некоторые оксидоредуктазы способны использовать в качестве акцепторов электронов NAD^+ , и NADP^4 , но большая их часть использует только один из них. Обобщая, можно сказать, что оксидоредуктазы млекопитающих, которые участвуют в биосинтетических процессах (например, в синтезе жирных кислот или стероидов), обычно используют в качестве восстановителя NADPH , тогда как в катаболизме участвуют оксидоредуктазы использующие NADH .

Модель «ключ—замок»

Первоначальная модель каталитического центра, предложенная Эмилем Фишером, трактовала взаимодействие субстрата и фермента по аналогии с

Модель "Ключ-замок"



Модель индуцированного соответствия

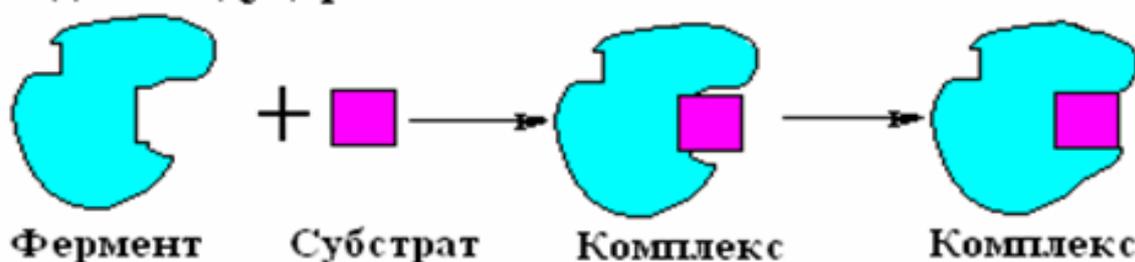


Рисунок 57: Модели взаимодействия фермента и субстрата системой «ключ — замок». Эта модель, которую иногда называют моделью «жесткой матрицы», не утратила своего значения для понимания некоторых свойств ферментов, например их способности к строго определенному связыванию двух или большего числа субстратов, или для объяснения кинетики насыщения субстратом.

Модель индуцированного соответствия

Недостатком модели Фишера является подразумеваемая в ней жесткость каталитического центра. Более общий характер имеет модель

индуцированного соответствия, предложенная Кошландом. Эта модель основывается на весьма убедительных экспериментальных данных. Ее существенной чертой является гибкость каталитического центра. В модели Фишера каталитический центр считается заранее подогнанным под форму молекулы субстрата. В модели же индуцированного соответствия субстрат индуцирует конформационные изменения фермента, и лишь в результате этих изменений аминокислотные остатки и другие группы фермента принимают пространственную ориентацию, необходимую для связывания субстрата и катализа. При этом другие аминокислотные остатки могут погрузиться в глубь молекулы фермента. Субстрат по мере сближения с ферментом индуцирует в последнем конформационные изменения, в результате которых соответствующие группы занимают положение, необходимое для связывания субстрата и для катализа. Одновременно меняется пространственное расположение других остатков — Lys и Met теперь оказываются сближенными. Аналоги субстрата тоже могут вызывать конформационные изменения, но не все из них являются «правильными». При связывании истинного субстрата (*A*) все группы занимают нужное положение. При связывании же аналога субстрата — более объемного или, наоборот, меньшего по размеру — индуцируется неправильное расположение этих групп.

Факторы, влияющие на каталитическую активность

Ферментативная активность зависит в основном от следующих факторов:

1. концентрация фермента
2. концентрация субстрата,
3. температура,
4. pH,
5. присутствие ингибиторов.

Температура

В некотором ограниченном интервале температур скорость ферментативной реакции повышается с ростом температуры. Коэффициент, указывающий, во сколько раз повышается скорость реакции при повышении температуры на 10° , называется **температурным коэффициентом** и обозначается Q_{10} . Для многих биологических реакций при повышении температуры на 10^0 скорость удваивается ($Q_{10} = 2$) и, аналогично, при понижении температуры на 10^0 уменьшается вдвое. Многие физиологические процессы (например, скорость сокращения изолированной сердечной мышцы) тоже характеризуются коэффициентом Q_{10} , близким к двум. Однако при некоей оптимальной температуре скорость реакции максимальна. Повышение скорости реакции по мере приближения к оптимальной температуре объясняется увеличением кинетической энергии реагирующих молекул. При дальнейшем повышении температуры кинетическая энергия молекулы фермента становится

достаточной для разрыва связей, поддерживающих вторичную структуру фермента в нативном, каталитически активном состоянии (происходит тепловая денатурация фермента). Вторичная и третичная структура фермента разрушается, что сопровождается потерей каталитической активности.

Для большинства ферментов оптимальная температура равна или выше той температуры, при которой в норме находятся клетки. Для ферментов микроорганизмов, адаптировавшихся к обитанию в природных горячих источниках, оптимальная температура может быть близка к точке кипения воды.

рН

Умеренные изменения рН оказывают влияние на **ионное состояние фермента**, а зачастую и субстрата. Как показывают измерения ферментативной активности при различных рН, оптимум активности находится обычно между рН 5,0 и 9,0. Вместе с тем отдельные ферменты, например пепсин, активны при значениях рН, лежащих далеко за пределами этого интервала.

Зависимость активности от рН определяется следующими факторами.

1. **Денатурацией фермента** при очень высоких или очень низких рН. При изменении рН ферменты могут претерпевать конформационные изменения. Для поддержания активной третичной или четвертичной структуры может оказаться необходимым присутствие определенного заряда на группе, удаленной от области связывания субстрата; именно такая ситуация наблюдается в случае гемоглобина. Если заряд этой группы изменится, могут произойти частичное развертывание белковой цепи, или, наоборот, компактизация молекулы, или же ее диссоциация на протомеры — во всех случаях с потерей активности.

2. **Изменением величины заряда молекул субстрата или фермента.** Активность фермента может изменяться в результате изменений либо его структуры, либо заряда функциональных остатков, участвующих в катализе или связывании субстрата. Рассмотрим для примера взаимодействие отрицательно заряженного фермента (Enz^-) с положительно заряженным субстратом (SH^+). При низких рН происходит протонирование Enz^- , при высоких рН — депротонирование субстрата. Поскольку, взаимодействовать друг с другом могут только SH^+ и Enz^- , при крайних значениях рН эффективная концентрация Enz^- или SH^+ будет низкой, что приведет к снижению скорости реакции.

Концентрация фермента

Во многих случаях бывает недостаточно знать, что данный фермент присутствует в системе, нужна еще информация о его количестве. При определенных условиях скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента. Это бывает не всегда, что можно проиллюстрировать на примере прямой реакции, идущей в равновесных

условиях. Даже если мы знаем, что прямая реакция действительно идет, нам будет казаться, что скорость ее равна нулю, поскольку с такой же скоростью идет и обратная реакция. Когда же ферментативная реакция только *начинается*, продукт еще практически отсутствует и обратная реакция не идет. Кроме того, на начальной стадии реакции концентрация субстрата соответствует его исходному количеству. Поэтому скорость в начале реакции, т.е. ее **начальная скорость (v)**, будет прямо пропорциональна концентрации фермента $[Enz]$.

Фермент является реагентом, который соединяется с субстратом, образуя **фермент-субстратный комплекс $Enz - S$** , распадающийся на свободный фермент и продукт P . В простейшей форме можно записать

Таким образом, **концентрация фермента не оказывает влияния на константу равновесия. K_{eq} не зависит от того, каким образом достигается равновесие—с участием фермента или без него** (вспомним о величине ΔG°). Фермент меняет путь, по которому идет реакция, но не конечные (равновесные) концентрации реагентов и продуктов, от которых зависят K_{eq} и ΔG° .

Концентрация субстрата

Далее будут рассмотрены ферментативные реакции, в которых имеется единственный субстрат и единственный продукт. Такая ситуация действительно наблюдается для некоторых ферментативных реакций, однако большинство из них протекает с участием двух и более субстратов и продуктов. Это, однако, нисколько не снижает ценности дальнейших рассуждений. То, что справедливо для одного субстрата, остается верным и для двух.

При увеличении концентрации субстрата $[S]$ и сохранении всех остальных условий **начальная скорость v** (скорость, измеряемая в период, когда израсходована очень малая доля субстрата) будет повышаться до максимальной величины K_{max} , после чего останется постоянной.

По мере повышения концентрации субстрата скорость будет расти до тех пор, пока не произойдет насыщения фермента субстратом. Измеренная в таких условиях начальная скорость уже не будет возрастать при дальнейшем повышении концентрации субстрата. Отметим, что субстрат обычно берут в значительном молярном избытке по отношению к ферменту. Например, если фермент с мол. массой 100000 взаимодействует с субстратом с мол. массой 100 и оба присутствуют в концентрации 1 мг/мл, то на каждый моль фермента будет приходиться 1000 молей субстрата. Более реальными являются следующие величины:

$$[Enz] = 0,1 \text{ мкг/мл} = 10^{-9} \text{ М}, [S] = 0,1 \text{ мг/мл} = 10^{-3} \text{ М},$$

т.е. молярный избыток субстрата по отношению к ферменту составляет 10^6 .

Даже если $[S]$ уменьшить в 100 раз, его концентрация все еще в 10000 раз будет превышать концентрацию фермента. В точках А и В в комплексе с субстратом находится лишь часть молекул фермента, хотя молекул субстрата намного

больше, чем молекул фермента. Это происходит потому, что константа равновесия реакции $\text{Enz} + \text{S} \rightleftharpoons \text{Enz} - \text{S}$ (образование комплекса $\text{Enz} - \text{S}$) хотя и велика, но конечна. Таким образом, **в точках А и В повышение или понижение [S] будет приводить к увеличению или уменьшению доли молекул Enz, связанных с S (т. е. доли молекул Enz — S), и v будет зависеть от [S].** В точке С практически все молекулы фермента связаны с субстратом, и дальнейшее повышение [S], хотя и повысит частоту столкновений Enz с S, не сможет привести к повышению скорости реакции—среди молекул фермента уже не будет таких, которые были бы свободны для реакции с субстратом.

Случай В представляет особый теоретический интерес, поскольку при этом ровно половина молекул фермента насыщена субстратом. Соответственно скорость равна **половине максимальной скорости ($V_{max}/2$)**, достижимой при данной концентрации фермента.

Уравнение Михаэлиса-Ментен

Уравнение Михаэлиса—Ментен описывает зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Фермент E соединяется с субстратом S, образуя ES-комплекс; константа скорости этого процесса – k_1 . Судьба ES-комплекса складывается двояко: он может либо диссоциировать на E и S с константой скорости k_2 , либо подвергаться дальнейшему превращению, образуя продукт P, с константой скорости k_3 . Постулируется, что продукт реакции P не превращается в исходный субстрат S; это условие соблюдается на начальной стадии реакции, пока концентрация продукта не достигает ощутимого количества.



Как связана скорость катализа с концентрацией субстрата и фермента и скоростями отдельных этапов реакции? Начнем с того, что скорость ферментативной реакции равна произведению концентрации комплекса ES на константу k_3 :

$$V = k_3[\text{ES}]$$

Выразим [ES] через известные величины. Скорости образования и распада ES составляют:

$$\text{Скорость образования ES} = k_1 [\text{E}][\text{S}]$$

$$\text{Скорость распада ES} = (k_2 + k_3)[\text{ES}]$$

Определим скорость катализа в стационарных условиях. Стационарные условия характеризуются тем, что концентрация промежуточных продуктов остается постоянной, тогда как концентрации исходных и конечных продуктов меняются. Это имеет место в том случае, когда скорость синтеза ES-комплекса

оказывается равной скорости его распада. Если левые части равенств равны между собой, то равны и правые, т.е.

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

Преобразуем это уравнение:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

Уравнение можно упростить, если ввести новую константу K_M , называемую константой Михаэлиса:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Введем K_M в уравнение:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

Рассмотрим числитель в последнем выражении. Концентрация несвязанного субстрата $[S]$ практически равна общей концентрации субстрата при условии, что концентрация фермента значительно ниже концентрации субстрата. Концентрация несвязанного фермента (E) равна общей концентрации фермента E_T минус концентрация комплекса ES :

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

Подставим это выражение в уравнение:

$$[ES] = ([E_T] - [ES])[S]/K_M$$

Решение уравнения относительно $[ES]$ дает:

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]/K_M}{1 + [S]/K_M}$$

ИЛИ

$$[ES] = [E_T] \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Подставим это выражение в уравнение скорости реакции:

$$V = k_3 [E_T] \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{MAX} = k_3 [E_T]$$

После преобразования получаем окончательный вариант уравнения Михаэлиса—Ментен:

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

Графическое определение константы Михаэлиса K_M

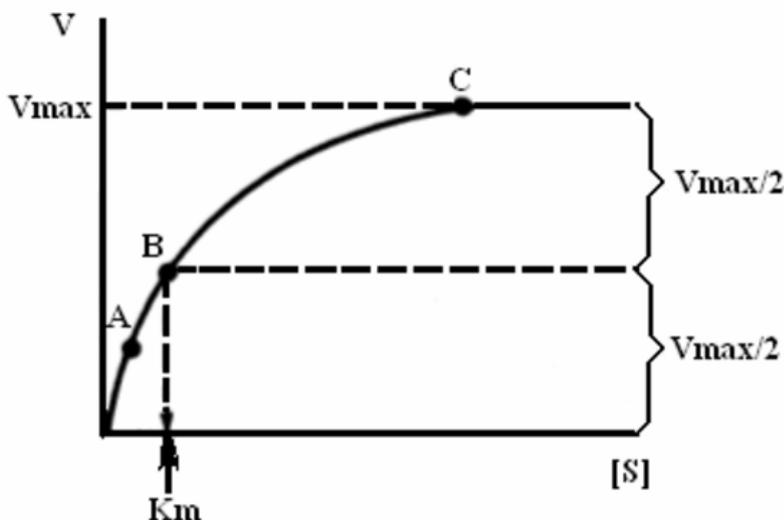


Рисунок 58: График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (описывается уравнением Михаэлиса-Ментен)

Концентрация субстрата, при которой скорость составляет половину максимальной, обозначается через K_M и называется константой Михаэлиса. Ее можно определить из графика зависимости v от $[S]$. Обратите внимание, что K_M имеет размерность молярной концентрации.

Когда $[S]$ приближается к K_M , v становится весьма чувствительной к изменению $[S]$; в этой области фермент

работает со скоростью, равной половине максимальной. Многие ферменты характеризуются такими значениями K_M , которые примерно соответствуют физиологическим концентрациям их субстратов.

Уравнение Михаэлиса—Ментен описывает поведение многих ферментов при изменении концентрации субстратов. Используя это уравнение, зависимость начальной скорости ферментативной реакции от $[S]$ и K_M можно проиллюстрировать на следующих конкретных примерах.

1. $[S]$ много меньше K_M (точка А).

В этом случае величину $[S]$ в знаменателе можно опустить, и он будет практически равен K_M . Отношение двух констант, V_{max} и K_M , можно заменить новой константой K . Таким образом, имеем:

Другими словами, когда концентрация субстрата значительно ниже той, при которой скорость реакции составляет половину максимальной (т. е. значительно меньше K_M), начальная скорость v пропорциональна концентрации субстрата $[S]$.

2. $[S]$ много больше K_M (точка С).

В этом случае член K_M в знаменателе можно опустить, т.е. Это означает, что при концентрации субстрата $[S]$, намного превышающей K_M начальная скорость v равна максимальной V_{max}

3. $[S] = K_M$ (точка В).

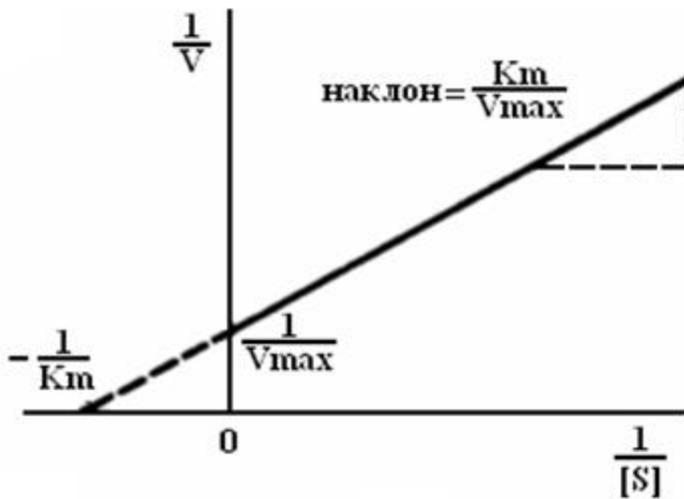
Это означает, что при концентрации субстрата, равной K_M , начальная скорость реакции v составляет половину максимальной. Отсюда же следует способ оценки K_M : надо экспериментально определить концентрацию субстрата, при которой начальная скорость равна половине максимальной.

Как видно из рисунка график, описываемый уравнением Михаэлиса-Ментен, является кривой, чтобы кривая была точной необходимо максимальное количество точек для ее построения, следовательно, необходимо множество замеров скорости реакции с разными концентрациями субстрата. Тогда как для построения прямой требуется всего 3-5 точек, следовательно 3-5 замеров, именно поэтому было проведено преобразование уравнения Михаэлиса-Ментен. График делается в обратных координатах $1/V$ и $1/[S]$. Для преобразования необходимо 1 разделить на уравнение:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Как видно из преобразования, данное уравнение можно свести к уравнению прямой $y = ax + b$, где $y = 1/V$; $x = 1/[S]$. Данное преобразование по фамилиям авторов получило название — преобразование Лайнуивера-Бэрка.

Используя график Лайнуивера—Бэрка на практике для оценки K_M , иногда сталкиваются с тем, что почти все точки оказываются в области низких концентраций субстрата. Это происходит в том случае, когда измерения



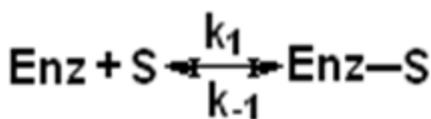
проводят через равные интервалы $[S]$. Чтобы этого избежать, измерения следует проводить при таких значениях $[S]$, которые соответствуют равным интервалам по шкале обратных величин.

Оценки K_M имеют практическую ценность. При концентрациях субстрата, в 100 раз превышающих K_M , фермент будет работать практически с максимальной скоростью, поэтому максимальная скорость (V_{max}) будет отражать количество

Рисунок 59: График преобразования Лайнуивера-Бэрка

присутствующего активного фермента. Это немаловажное обстоятельство используют для оценки содержания фермента в препарате. Значение K_M позволяет ориентироваться, какое количество субстрата следует добавить для определения V_{max} . Графики, построенные в обратных координатах, находят широкое применение при оценке действия ингибиторов.

С другой стороны K_M связана с константой диссоциации фермент-субстратного комплекса то есть со сродством фермента к субстрату.



$$K_d = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [S] = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M$$

$$k_{-1} \gg k_2 \quad \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$[S] = \frac{k_1}{k_{-1}} = K_d$$

Сродство фермента к субстрату равно величине, обратной константе диссоциации K комплекса Enz-S :

Иными словами, чем слабее выражена тенденция фермент-субстратного комплекса к диссоциации, тем выше сродство фермента к субстрату. Мерой K_d может ориентировочно служить значение K_M для данного фермента по отношению к его субстрату. Однако это возможно только в том случае, если справедливо допущение, использовавшееся при

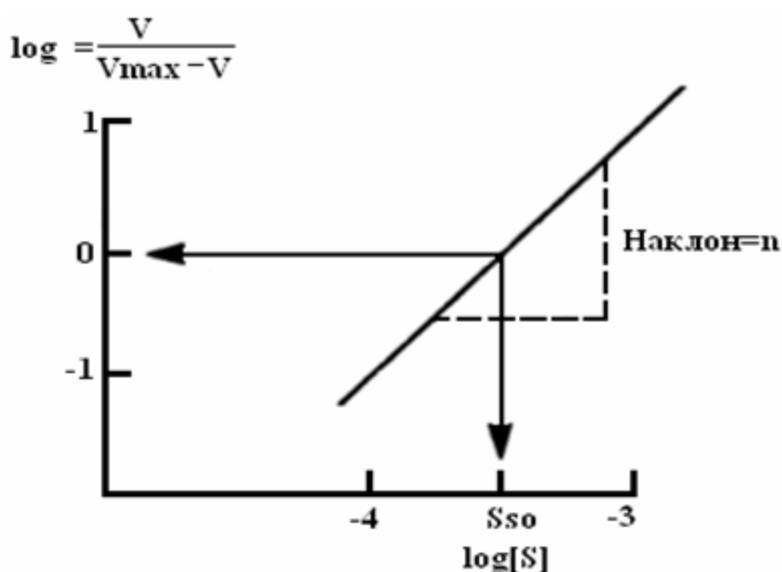
Рисунок 60: Соотношение между K_M и K_d

выводе уравнения Михаэлиса—Ментен. Оно состояло в том, что первая стадия ферментативной реакции идет быстро и при этом всегда на этой стадии поддерживается равновесие. Другими словами, скорость диссоциации $Enz-S$ на $Enz + S$ намного выше, чем скорость диссоциации на фермент - продукт: Из уравнения Михаэлиса — Ментен следует, что величина $[S]$, при которой $v = 1/2V_{max}$, равна

При этих условиях $1/K_M = 1/K_d$ и равно сродству фермента к субстрату. Если $k_2 + k_{-1}$ не равно k_{-1} , то $1/K_M$ даст заниженную оценку сродства.

Ограничения, присущие уравнению Михаэлиса-Ментен

Некоторые ферменты и другие лигандсвязывающие белки, например гемоглобин, не подчиняются классической кинетике насыщения Михаэлиса—



$$\log \frac{V}{V_{max} - V} = n \log[S] - \log k'$$

Рисунок 61: Уравнение Хилла и график, им описываемый

Хилла, первоначально предложенного для описания кооперативного связывания O_2 с гемоглобином.

Уравнение Хилла, преобразованное так, чтобы график в соответствующих координатах представлял собой прямую, имеет вид, где k' — константа. Из уравнения следует, что в условиях, когда $[S]$ мало по сравнению с k' , скорость реакции возрастает как n -я степень $[S]$. Приведен график Хилла, построенный по кинетическим данным для фермента, характеризующегося кооперативным связыванием субстрата. График зависимости $\log (V/V_{max} - V)$ от $\log [S]$ представляет собой прямую с тангенсом угла наклона, равным n , где n — эмпирический параметр, зависящий от числа субстрат связывающих центров и

Ментен. График зависимости v от $[S]$ носит в этом случае сигмоидный характер. Это обычно указывает на кооперативное связывание субстрата многими центрами — связывание с одним центром влияет на связывание с другим, как это происходит с гемоглобином. В таком случае описанный выше метод графической оценки концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, оказывается непригодным (прямой в соответствующих координатах уже не получается). Здесь следует обратиться к графическому представлению уравнения

характера взаимодействия между ними. При $n = 1$ связывающие центры не зависят друг от друга. При $n > 1$ между центрами имеется кооперативное взаимодействие; чем больше n , тем выше степень кооперативности и тем более выражена сигмоидность кривых насыщения. При $n < 1$ говорят об отрицательной кооперативности. Когда скорость реакции равна половине максимальной ($V = V_{\max}/2$, $V/(V_{\max} - V) = 1$ и $\log [V/(V_{\max} - V)] = 0$). Таким образом, чтобы определить величину S_{50} (концентрацию субстрата, при которой скорость вдвое меньше максимальной), нужно из точки на прямой, для которой $\log [V/(V_{\max} - V)] = 0$, опустить перпендикуляр на ось x .

Ингибирование активности ферментов

Различают два больших класса ингибиторов ферментативной активности — конкурентные и неконкурентные — на основании того, ослабляется (конкурентное ингибирование) или не ослабляется (неконкурентное ингибирование) их ингибирующее действие при повышении концентрации субстрата. На практике многие ингибиторы не проявляют тех свойств, которые характерны для чисто конкурентного или чисто неконкурентного ингибирования. Другой способ классификации ингибиторов основывается на характере места их связывания. Одни из них связываются с ферментом в том же месте, что и субстрат (в каталитическом центре), а другие — на значительном расстоянии от активного центра (в аллостерическом центре). Так же ингибирование подразделяется

Конкурентное ингибирование аналогами субстрата

Классическое конкурентное ингибирование основано на связывании ингибитора с субстрат-связывающим (каталитическим) центром. Химическая структура аналога субстрата, действующего как ингибитор (I), обычно сходна со структурой субстрата (S). Поэтому ингибитор может обратимо связываться с ферментом, образуя вместо $\text{Enz} - \text{S}$ комплекс $\text{Enz} - \text{I}$, т.е. фермент-ингибиторный комплекс. Когда в реакционной смеси одновременно присутствуют и субстрат, и ингибитор указанного типа, они конкурируют за один и тот же связывающий центр на поверхности фермента. Один из наиболее подробно изученных примеров конкурентного ингибирования — это ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом (I), конкурирующим за один и тот же центр с субстратом сукцинатом (S). В случае конкурентного ингибирования идет воздействие на K_m , при повышении концентрации субстрата, вероятность связывания с ингибитором уменьшается и скорость реакции увеличивается, таким образом при конкурентном ингибировании скорость реакции может быть близкой к максимальной в норме, но при больших концентрациях субстрата.

Обратимое неконкурентное ингибирование

Как следует уже из самого названия, в этом случае конкуренция между субстратом (S) и ингибитором (I) отсутствует. При этом ингибитор обычно ничем не напоминает S и, как можно предположить, связывается с другим

участком фермента. Обратимые неконкурентные ингибиторы понижают максимальную скорость, достижимую при данном количестве фермента (понижают V_{max}), но, как правило, не влияют на K_M . Поскольку I и S связываются с разными центрами, возможно образование как комплекса $Enz - I$, так и комплекса $Enz - IS$. Комплекс $Enz - IS$ тоже распадается с образованием продукта, однако с меньшей скоростью, чем $Enz - S$; поэтому реакция будет замедляться, но не остановится. Таким образом, могут протекать следующие конкурентные реакции:

Необратимое неконкурентное ингибирование

Ферментативная активность может уменьшаться в присутствии многих «ядов», таких, как иодацетамид, ионы тяжелых металлов (Ag^+ , Hg^{2+}) окисляющие агенты и т. д. В присутствии одного или нескольких субстратов или продуктов скорость инактивации фермента может снижаться. В данном случае ингибирование происходит за счет частичной денатурации фермента.

Способы регуляции работы ферментов in vivo

Поток углерода, «проходящий» через ту или иную ферментативную реакцию, можно регулировать, изменяя следующие параметры: 1) абсолютное количество присутствующего фермента; 2) пул реагентов (помимо фермента); 3) каталитическую эффективность фермента. Большинство форм жизни использует все три типа регуляции.

Регуляция количества фермента путем регуляции скорости его синтеза и распада

Абсолютное количество фермента в клетке определяется скоростями его синтеза ($K_{синт}$) и распада ($K_{расп}$). Соответственно количество фермента увеличивается либо в результате повышения скорости его синтеза (увеличением $K_{синт}$), либо снижения скорости распада (уменьшением $K_{расп}$), либо обоими способами сразу. Регуляция на уровне экспрессии генов.

Превращение проферментов в активные ферменты

Ферментативная активность может регулироваться путем превращения неактивного профермента в каталитически активную форму. Чтобы перейти в такую форму, профермент должен подвергнуться ограниченному протеолизу, сопровождающемуся конформационными изменениями; при этом происходит либо демаскирование каталитического центра, либо его формирование. Синтез в форме каталитически неактивных проферментов является характерным свойством пищеварительных ферментов, а также ферментов системы свертывания крови и системы фибринолиза.

Компартментация ферментов

Роль компартментации (пространственного разделения) метаболических процессов в клетках эукариот, в том числе в клетках млекопитающих, трудно переоценить. Локализация специфических метаболических процессов в

цитозоле или в клеточных органеллах облегчает независимую регуляцию этих процессов. Развитая компартментация метаболических процессов особенно характерна для высших форм живых организмов — она позволяет осуществлять наиболее тонкую регуляцию метаболизма. Одновременно при этом возникает новая проблема — прохождение метаболитов через разделяющие барьеры. Эта проблема решается с помощью «челночных механизмов», переводящих метаболит в форму, которая способна проходить через барьер. Затем по другую сторону барьера происходит обратное превращение метаболита в первоначальную форму. В связи с наличием барьеров возникает потребность в функционировании, например, цитозольной и митохондриальной форм некоторых ферментов. Поскольку эти формы фермента физически разделены, их независимая регуляция облегчается.

Аллостерическая регуляция

В случае аллостерической регуляции низко-молекулярные соединения или аллостерические регуляторы связываются с ферментом в результате происходит изменение конформации белка. Необходимо вспомнить что при встраивании этой молекулы изменяются связи в составе белка, что характерно для связывания белка с любой молекулой в результате происходит перераспределение связей и как результат изменение конформации белка, эти молекулы могут привести к двум противоположным результатам. В зависимости от молекулы связи могут различаться, а, следовательно, и перестройки в молекуле белка, поэтому аллостерические модуляторы могут изменять конформацию белка либо в направлении увеличения сродства к субстрату, следовательно, увеличению активности белка, тогда молекула является положительным модулятором. И наоборот молекула, встраиваясь, изменяет конформацию белка, и в результате конформация белка становится менее активной, то есть происходит неконкурентное обратимое ингибирование.

Примерно в 1963 г. Моно обратил внимание на отсутствие структурного сходства между ингибитором, действующим на фермент по принципу обратной связи, и субстратом этого фермента. Отсутствие изостеричности с субстратом позволяет говорить об **аллостеричности** соответствующих эффекторов. Исходя из этого, Моно предположил, что ферменты, регулируемые такими **аллостерическими эффекторами** (в частности, ингибиторами по принципу обратной связи), связывают эффектор **в аллостерическом центре**, физически не совпадающем с каталитическим центром. Таким образом, **аллостерические ферменты** — это ферменты, активность каталитического центра которых изменяется под действием аллостерических эффекторов, связывающихся в аллостерическом центре. Данные о наличии у регуляторных ферментов физически обособленных аллостерических центров сводятся к следующему.

1. Регуляторные ферменты после модификации химическими или физическими методами часто становятся нечувствительны к аллостерическим эффекторам, сохраняя каталитическую активность.

2. Аллостерические эффекторы часто защищают **каталитический** центр от денатурации в условиях, когда субстрат такого защитного действия не оказывает.

3. Обнаружены мутантные клетки бактерий и млекопитающих, в которых регуляторные ферменты имели существенно иные регуляторные свойства, чем ферменты из клеток дикого типа, но обладали в точности такими же каталитическими свойствами.

4. Показано, что связывание субстратов и аллостерических эффекторов с регуляторным ферментом происходит независимо.

5. В некоторых ферментах (например, в АТКазе) аллостерический и каталитический центры локализованы в разных протеомерах.

Ковалентная модификация ферментов

Обратимое изменение каталитической активности ферментов может осуществляться путем ковалентного присоединения фосфатной группы (преобладает у млекопитающих) или нуклеотида (преобладает у бактерий). Ферменты, подверженные ковалентной модификации, которая сопровождается изменением их активности, называют обратимо модифицируемыми ферментами.

Обратимо модифицируемые ферменты могут находиться в двух состояниях, одно из которых характеризуется высокой, а другое — низкой каталитической эффективностью. В зависимости от конкретного случая более активным катализатором может быть либо фосфо-, либо дефосфофермент.

Обычно фосфорелируется специфический остаток серина и образуется остаток О-фосфосерина; реже фосфорелируется остаток тирозина с образованием остатка О-фосфотирозина. Хотя обратимо модифицируемый фермент может содержать много остатков серина или тирозина, фосфорелирование происходит в высшей степени избирательно и затрагивает лишь небольшое число (1—3) остатков. Эти участки, по всей вероятности, не являются частью каталитического центра; мы, таким образом, имеем еще один пример аллостерических эффектов.

Изоферменты.

Изоферменты — это ферменты отличающиеся активностью у одного организма и/или представителя организма, или в ходе онтогенеза а так же в популяции особей одного о вида.

Изоферментны отличаются как распределением в популяции, так в тканях организма. Также как и изобелки изоферменты могут по разному распределяться как в тканях организма, так и в ходе онтогенеза. Термин «изофермент» («изоэнзим») охватывает все вышеупомянутые физически различимые белки с данной каталитической активностью, однако на практике, и особенно в клинической медицине, его употребляют в более узком смысле, подразумевая физически различимые и поддающиеся разделению формы данного фермента, присутствующие в различных типах клеток данного

эукариотического организма, например человека. Изоэнзимы неизменно обнаруживаются в сыворотке и в тканях всех позвоночных, насекомых и в одноклеточных организмах. При этом число ферментов и их содержание сильно варьируют. Известны изоферментные формы дегидрогеназ, оксидаз, трансаминаз, фосфатаз, трансфосфорилаз и протеолитических ферментов. В различных тканях могут находиться разные изоферменты, и эти изоферменты могут иметь неодинаковое сродство к субстратам.

Изоэнзимы лактатдегидрогеназы различаются на уровне четвертичной структуры. Олигомерная молекула лактатдегидрогеназы (мол. масса 130000) состоит из четырех протомеров двух типов, Н и М (оба с мол. массой около 34000). Каталитической активностью обладает только тетрамерная молекула. Если порядок соединения протомеров не имеет значения, то протомеры могут быть скомпонованы пятью способами:

НННН

НННМ

ННММ

НМММ

ММММ

Маркерт подобрал условия для разрушения и реконструкции четвертичной структуры и сумел выяснить взаимоотношения между изоэнзимами лактатдегидрогеназы. Расщепление и реконструкция лактатдегидрогеназ I₁ и I₅ не приводят к образованию новых изоэнзимов. Следовательно, эти два изоэнзима содержат только один тип протомеров. Когда такой же процедуре была подвергнута смесь лактатдегидрогеназ I₁ и I₅, появились также формы I₂, I₃ и I₄. Соотношение изозимов соответствует приведенному ниже субъединичному составу:

I₁- НННН

I₂- НННМ

I₃-ННММ

I₄- НМММ

I₅ -ММММ

Синтез Н- и М-субъединиц детерминируется разными генетическими локусами, и они по-разному экспрессируются в разных тканях (например, в сердечной и скелетной мышцах).