

А.М. Копылов, А.В. Левашов, Е.Г. Завьялова

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

ИЗБРАННЫЕ ГЛАВЫ

Методическое пособие для бакалавров химического факультета филиала МГУ в г.Баку, обучающихся по специальности "Химия"

Допущено

Учебно-методическим объединением по классическому университетскому образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению ВПО 020100 - бакалавр химии

Баку - 2019

УДК 577.1

Копылов А.М., Левашов А.В., Завьялова Е.Г. Химические основы биологических процессов. Избранные главы. Москва, 2019. 270 с.

В настоящем пособии собраны материалы по избранным главам курса "Химические основы биологических процессов". Рассмотрены следующие темы:

Часть 1. Свойства живого, химический состав и организация клетки, основные типы химических взаимодействий и принципы образования супрамолекулярных комплексов, структура и функции белков, устройство биологических мембран и трансмембранных белков. Структура нуклеиновых кислот, роль нуклеиновых кислот в клетке, биосинтез нуклеиновых кислот и белков (биологические наномашинны).

Часть 2. Общие свойства и структура ферментов. Физическая химия ферментов: кинетика реакций и ингибирование ферментов. Прикладная энзимология и биотехнология. Ферментативный катализ в органическом синтезе, аналитической химии и медицинской диагностике, применение в качестве лекарственных средств.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ 1. Химия живого

Раздел I. Живое. Жизнь как система

Глава 1. Что такое жизнь с точки зрения химика

Введение. Проблемы, затрагиваемые в курсе ХОБП.....	9
Системный подход в биологии	11
Система.....	13
Классификация систем	17
Свойства живых систем.....	18
Что такое живое и жизнь с точки зрения химии в рамках системного подхода?.....	23
От биологии к химии	24
Эндосимбиотическая гипотеза.....	27

Глава 2. Молекулы и межмолекулярные взаимодействия в клетке

Типы химических взаимодействий в клетке	31
Ковалентные связи	32
Нековалентные взаимодействия	34
Молекулы клетки	37
Супрамолекулярные и макромолекулярные комплексы	41
Низкомолекулярные соединения	
<i>Вода, как структурообразующая среда</i>	46
<i>Липиды</i>	53
Липидный бислой.....	56

Глава 3. Макромолекулы клетки. Белки

Белки. Протеом.....	61
Уровни структуры белка.....	63

Аминокислоты.....	65
Первичная структура белка.....	69
Вторичная структура белка.....	76
Супервторичная структура.....	79
Домен.....	81
Третичная структура.....	81
Четвертичная структура.....	85
Динамика формирования пространственной структуры.....	86

Глава 4. Клетка как открытая система.

Мембранные белки

Биологическая мембрана.....	90
Транспорт молекул через биологическую мембрану.....	94
Трансмембранные белки, образующие каналы.....	96
Примеры транспорта молекул через биологические Мембраны.....	98
Пассивный транспорт	
<i>Водные каналы.....</i>	99
<i>Ионные каналы.....</i>	102
<i>Антибиотики – ионофоры.....</i>	106
Активный транспорт.....	
<i>Преобразование энергии в живых системах.....</i>	109
<i>Биоэнергетика.....</i>	116

Раздел II. Информационные потоки в клетке

Глава 5. Структура нуклеиновых кислот, ДНК

Химическая структура ДНК.....	121
Гетероциклические основания.....	125
Первичная структура ДНК.....	130
Методы определения первичной структуры ДНК....	131
Пространственная структура ДНК.....	134

Денатурация и ренатурация двойной спирали ДНК.....	139
Суперспирализация ДНК.....	144

Глава 6. Биосинтез нуклеиновых кислот

Репликация ДНК.....	148
Инициация синтеза ДНК	150
Элонгация синтеза ДНК	152
Термодинамика реакции биосинтеза нуклеиновых кислот.....	155
Биосинтез второй цепи ДНК	156
Ингибиторы синтеза ДНК – аналоги субстрата	159
Терминация репликации	160
Репликон.....	160
Энзимология репликации	161
Транскрипция ДНК - биосинтез РНК.....	166
Чем РНК отличается от ДНК	167
Инициация транскрипции	169
Элонгация транскрипции.....	172
Терминация транскрипции	174
Ингибиторы транскрипции	175

Глава 7. Структура и функция РНК. Биосинтез белка

Первичная структура РНК.....	178
Вторичная структура РНК.....	178
Третичная структура РНК	179
Пространственная структура тРНК.....	181
Биосинтез белка.....	182
Генетический код	183
Функциональная структура тРНК	187
Аминоацилирование тРНК.....	189
Трансляция - ступенчатый матричный биосинтез полипептида.....	192

Биосинтез белка на рибосоме, трансляция	194
Ингибиторы трансляции.....	203

ЧАСТЬ 2. Ферменты

<i>Введение</i>	207
-----------------------	-----

Глава 1. Общие свойства и структура ферментов

Ферменты как природные катализаторы.

Биосинтез и матурация ферментов. Локализация и источники ферментов	212
Выделение и очистка ферментов	214
Классификация ферментов.....	216

Глава 2. Физическая химия ферментов

Кинетика ферментативных реакций.....	219
Определение кинетических параметров уравнения Михаэлиса-Ментен.....	231
Регуляция кинетических параметров ферментативных реакций	235
Ингибирование ферментативных реакций	235
<i>Необратимое ингибирование</i>	236
<i>Обратимое ингибирование</i>	239
pH – Зависимости скорости ферментативных реакций	244
Температурные зависимости скорости ферментативных реакций	250
Физико-химические причины ускорения ферментативных реакций	254
Химические механизмы ферментативного катализа	259

Глава 3. Прикладная энзимология

Биотехнология и прикладная энзимология.....	264
Иммобилизация ферментов.....	266

<i>Носители для иммобилизации ферментов</i>	267
<i>Методы физической иммобилизации</i>	268
<i>Химические методы иммобилизации ферментов</i>	269
<i>Преимущества и недостатки иммобилизованных ферментов</i>	272
<i>Ферментативный катализ в химии</i>	273
<i>Ферменты в аналитической химии (и медицинской диагностике)</i>	277
<i>Ферменты в медицине (терапии)</i>	280
<i>Рекомендуемая литература</i>	284



Часть 1
ХИМИЯ ЖИВОГО

Раздел I. Живое. Жизнь как система

Глава 1

Что такое жизнь с точки зрения химика

Пограничные разделы естественных наук и других областей знаний для изучения явлений живого и жизни. «Биологическая химия», «Химическая биология» и «Химические основы биологических процессов». Побуждение к системному подходу: общие свойства всех систем, особенности живых систем. Живое/жизнь в биологии: разнообразие и систематика. Клеточная теория. Компартиментализация. Жизнь как сложная открытая динамическая система.

Курс «Химические основы биологических процессов» призван рассмотреть с точки зрения химии то главное, что отличает «живое» от «неживого». Другие названия областей знаний для изучения химических принципов организации живых систем могут быть построены двумя комбинациями названий двух классических естественных наук - химии и биологии: химическая биология или биологическая химия.

Классическое определение пограничных наук может быть образовано с помощью двойного названия: методология познания определяется первым словом, а предмет – вторым. Например, «физическую химию» назвали так потому, что теоретическая и экспериментальная методология физики была использована для понимания химических явлений.

М.В. Ломоносов еще в далеком 1752 г. создал первый «Курс истинной физической химии» для студентов академического университета Петербургской академии наук России.

Согласно логике словообразования термина «физическая химия» использование теоретической и экспериментальной методологии химии для понимания основ биологических явлений (живое, жизнь) нужно назвать «химической биологией». По примеру с физической химией, которая интегрирует множество частных разделов (термодинамика, лазерная химия, проч.), все частные разделы изучения химии живого (биохимия, биоорганическая химия, молекулярная биология, проч.) также могут быть интегрированы в химическую биологию.

По сути, название «молекулярная биология» наиболее близко к названию «химическая биология», поскольку подчеркивает молекулярный, т.е. химический, уровень изучения биологии. Однако, в биологии под этим термином понимают изучение не всех, а только информационных процессов.

Другой подход к словообразованию для названия пограничной фундаментальной естественной науки – это традиционные для химии двойные названия «объект исследования как прилагательное + химия», что логически определяет их как часть химии, и которые изучаются на химическом факультете: органическая химия, неорганическая химия, коллоидная химия, радиационная химия.

Название «аналитическая химия» определяется через цель исследования.

В этом смысле название курса о химических принципах организации живых систем должен называться «биологической химией». Однако, это название уже давно и традиционно используется для описания метаболических процессов.

Именно поэтому для курса, который рассматривает самые основные химические принципы построения живых систем и самые основные химические процессы в живых системах, отличающие «живое» от «неживого», наиболее приемлемым названием является «Химические основы биологических процессов» (ХОБП).

Системный подход в биологии

Еще одна особенность курса заключается в том, что он включает в себя вновь возникшие тенденции в развитии наук о живом. Современные тенденции имеют два противоположных, но дополняющих друг друга направления. С одной стороны – это «химическая биология», которую можно рассматривать как пример редукционизма - попытку упростить изучаемую систему живого и выявить основные фундаментальные химические закономерности. С другой стороны – это формирующийся на наших глазах новый раздел знания под названием «системная биология» - попытка интегрировать все имеющиеся текущие знания для всестороннего и комплексного описания системы живого, включая большие массивы данных, организованные в базы данных, специальные алгоритмы работы с такими массивами, суперкомпьютерные вычисления.

Почему именно сегодня стало возможным развивать системный подход, что мешало сделать это раньше? На этот вопрос нет простого ответа; тем не менее, ряд определяющих факторов очевиден. Во-первых, это колоссальная скорость накопления новых данных высокого качества и точности. Уже полученная информация во много раз превышает возможности ее обработки нашим мозгом; скорость возрастания ее объема требует создания принципиально новых подходов и алгоритмов к ее переработке и осмыслению. Скажем, сегодня совсем не очевидно решение даже такой простой проблемы, как визуализация мно-

гомерных кинетических данных. Это, в свою очередь, требует и формулировки вопросов иного качества, которые мы задаем природе. Например, как описать функционирование ансамбля биологических молекул, который изменяется во времени по количеству и качеству компонентов? Модель должна быть количественной и манипулировать сотнями (может и тысячами) параметров. Как использовать максимальную емкость контента (англ. *content* - содержание)? Например, модели могут строиться во временных координатах и иметь модульный характер; модули могут выстраиваться в иерархию, способную адаптироваться к переменным условиям. Подобные сложные подходы к описанию «живого», в том числе и химические, будут определять более полное понимание функционирования живых систем.

*Колоссальный массив экспериментальных биологических данных вызвал необходимость развития прикладных математических методов, позволяющих осмысленно оперировать такими объемами. Например, контекстный анализ первичных структур белка и нуклеиновых кислот является предметом изучения биоинформатики, которая развивает алгоритмы и программное обеспечение для хранения, организации и анализа больших массивов данных (*big data*), а также ищет подходы для получения биологических знаний принципиально нового качества.*

Рассмотрим еще несколько тенденций в интеграции соседних пограничных естественных наук при изучении живого. Благодаря появлению принципиально новых и мощных физических и физико-химических подходов к изучению биологических явлений важной частью химической биологии стала «физико-химическая биология». Привлечение математических методов для построения моделей

живых систем, включая алгоритмические и компьютерные, привело к появлению математической биологии, в отдельную часть которой выделилась «биоинформатика».

И, наконец, возможность получения точных биологических знаний в медицине привела к возникновению т.н. «фундаментальной медицины». Кроме набора практических приемов, используемых традиционной медициной, появилась система научных знаний для диагностики, лечения и профилактики заболеваний. Ее новыми важными разделами стали «доказательная медицина» и «персонализированная медицина».

После того, как мы дали название курсу ХОБП и определили его место среди классических естественных наук, попробуем дать такое частное определение понятий «живого» и «жизни», которое позволит нам структурировать многочисленные химические подходы для описания этих сложных явлений. Сделать это непросто, поскольку общепринятого стандартного определения этих понятий на молекулярном уровне пока не существует.

Рассмотрим «живое» в рамках общего понятия «системы». Из множества определений «системы», приведем два.

Система

Система (греч. *systema* - целое, составленное из частей) – множество взаимосвязанных объектов/элементов и ресурсов, организованных в единое целое и противопоставляемое среде. Другое определение: *система* – совокупность сущностей (объектов, элементов) и связей между ними (материальных и/или информационных), выделенных из среды с определенной целью и на определенное время. Простейшее описание системы состоит из определения отдельных ее частей, их функции и взаимодействия.

Сложная система может строиться по принципу иерархии. Например, в рамках выбранной системы какой-то элемент состоит из отдельных частей, тогда он будет *подсистемой* данной системы.

Даже при беглом взгляде на эти определения видно, что применительно к биологии (живому) понятие «система» будет равнозначно понятию «клетка», а отдельные ее подсистемы – это многочисленные внутриклеточные структуры, которые образованы молекулами и их комплексами разной природы и разной сложности.

Основным следствием применения понятия «система» для описания клетки является тезис «порядок из хаоса». Другими словами, для формирования системы живого необходимо отделиться от внешней среды биологической мембраной. Внутри клетки необходимо из молекул и их комплексов сформировать структуры, которые будут выполнять какие-то функции. Поскольку создание определенных структур связано с выполнением работы по упорядочиванию молекул, которые изначально были разупорядочены (уменьшение энтропии), то такая система должна быть открытой, то есть границы системы должны обеспечивать обмен с окружающей средой веществом и трансформацию энергии из одной формы в другую. Поддержание и функционирование такой клеточной системы направлено против хаоса, поэтому требует непрерывной трансформации различных форм энергии в энергию взаимодействия молекул внутри клетки.

Одно из интересных термодинамических определений живого дано Э.С. Бауэром: «живые системы никогда не бывают в равновесии и исполняют за счет своей свободной энергии постоянную работу против равновесия, требуемого законами физики и химии при существующих внешних условиях» (Бауэр Э. С. Теоретическая биология. М. — Л.: Изд. ВИЭМ, 1935. — 206 с., стр. 43).

Десять лет спустя ему вторит знаменитый Э. Шредингер в своей книге «Что такое жизнь? Физические аспекты живой клетки»: «Как организму удастся достичь концентрации порядка и избежать беспорядка атомного хаоса второго закона термодинамики?».

*Вот так эту формулировку «живого» поясняет А.Л. Шамис (с коррекцией Копылова А.М. и Завьяловой Е.Г.). «Этот принцип устойчивого неравновесия живых систем Бауэра является всеобщим законом биологии, определяющим отличие живой материи от мертвой. Сущность этого отличия состоит в том, что живое не находится в равновесии с окружающим. И наоборот, равновесие – это состояние смерти. Живое должно постоянно активно выполнять работу для поддержания собственного неравновесного состояния, для сохранения своего порядка. У живой материи с момента ее возникновения появляется целевая функция – сохранение себя во времени и пространстве от перехода в хаос, от диссипации (лат. *dissipatio* — рассеивание). Эта цель может достигаться только собственной работой, собственной непрерывной активностью. Такое поддержание неравновесного состояния в первую очередь основывается на синтезе и расщеплении реакционноспособных химических соединений, имеющих повышенную энергию связей; например, пирофосфатов (Шамис А.Л. Вектор эволюции. Жизнь, эволюция, мышление с точки зрения программиста. М.: Книжный дом «Либроком», 2013. – 200 с.).*

«Живое», клетка - это СЛОЖНАЯ ОТКРЫТАЯ динамическая адаптивная эволюционирующая СИСТЕМА. Кратко прокомментируем перечисленные свойства с точки зрения химии. Сложная система клетки состоит из множества элементов - молекул. Между элементами существуют

материальные связи - молекулы взаимодействуют друг с другом. Материальные связи упорядочены и обеспечивают передачу информации; например, с молекул ДНК информация переписывается на молекулы РНК и далее белка. Из этого следует, что свойства системы не определяются как простая сумма свойств отдельных элементов — это так называемая неаддитивность. Это означает, что для того, чтобы понять, как система функционирует как целое, мало просто изучить свойства и поведение всех отдельных элементов системы. Из этого следует, что споры о том, можно ли свести описание биологических явления к простой сумме химических явлений, лишены смысла. Очевидно, что такие попытки противоречат самой сути системного подхода.

Отметим еще одно очень интересное и критичное свойство системы живого, отсутствие строгого детерминизма. Как поведение, так и связи каждого элемента системы живого редко определяются линейными причинно-следственными законами, очень часто они носят вероятностный характер. Например, степень конформационной подвижности макромолекулы может определять ее ответ на воздействие, ее поведение. В клетке, определенная молекула может взаимодействовать с другой молекулой не всегда; вероятность этого события зависит, например, от конкретных условий в данный момент времени. Кроме того, даже сам факт, что целевая молекула будет в наличии, тоже может определяться вероятностью. Как результат - сложные системы нелинейны. Они редко отвечают на воздействие единственным и предсказуемым образом, они редко развиваются по единственному и предсказуемому пути. И это еще одна причина неаддитивности сложных систем живого.

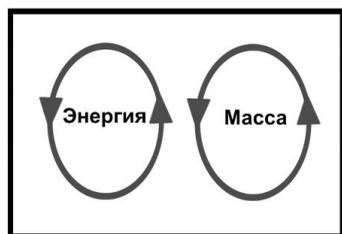
Еще одно интересное свойство – «возникающее (или появляющееся) свойство». В динамических сложных си-

стемах, как в ответ на изменения в самой системе, так и в ответ на внешние воздействия, появляются совсем новые свойства, которые до этого не существовали.

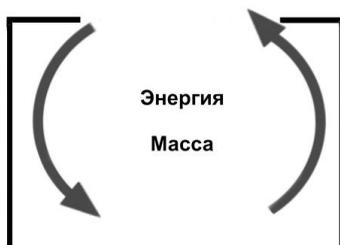
Классификация систем

Все системы можно классифицировать по разным признакам. Например, по происхождению системы делятся на естественные (природные), искусственные и смешанные. Естественные системы могут быть неорганическими, биологическими, экологическими и проч. По способам взаимодействия с окружающей средой разделим системы на закрытые и открытые. Для закрытых систем нет обмена с окружающей средой веществом. Согласно второму закону термодинамики (об энтропии) для закрытых систем характерно увеличение беспорядка для элементов системы: например, газ в замкнутом объеме старается равномерно распределиться по всему объему. Закрытые системы подразделяются на замкнутые и изолированные. Замкнутые системы обмениваются и конвертируют только разные формы энергии и не обмениваются веществом; в изолированных системах исключен любой обмен.

Открытые системы обмениваются с окружающей средой веществом и конвертируют разные формы энергии. Поэтому, в отличие от закрытых систем, в открытых системах могут происходить такие нетривиальные явления, как усложнение, спонтанное возникновение порядка и самоорганизация. В случае молекул, как элементов системы живого, именно эти процессы приводят к возникновению упорядоченных надмолекулярных комплексов (супрамолекулярных комплексов, подсистем), которые по мере их дальнейшего усложнения и эволюции объединяются в живую систему.



Изолированная система



Открытая система



Сложная система

Рисунок 1.1. Типы систем. Изолированная система не взаимодействует с окружающей средой. Открытая система осуществляет обмен материей и энергией. Сложная система состоит из нескольких подсистем, взаимодействующих друг с другом.

Свойства живых систем

Рассмотрим общие свойства любых систем, включая живые системы. Даже их простое перечисление наглядно демонстрирует сходство живых систем с системами вообще. Сгруппируем свойства систем по признакам.

1) Свойства, связанные с целями и функциями системы. Цели и функции самой системы не совпадают с целями и функциями элементов системы. Интересы системы выше, чем интересы ее элементов. Неаддитивность уже

обсуждали - результаты действия элементов в системе нелинейны. *Синергичность* – если целенаправленность действий элементов системы совпадает, то это усиливает эффективность действий системы в целом.

2) Свойства, связанные со структурой системы, иногда похожи на функциональные свойства. Целостность – первичность целого по отношению к элементам. Структурность – возможность разложения системы на элементы и установление связей между ними. *Иерархичность* – каждый элемент системы может рассматриваться как подсистема другой системы. Неаддитивность – несводимость свойств системы к сумме свойств ее элементов.

3) Свойства, связанные с ресурсами и взаимодействием со средой. *Надежность* – функционирование системы при выходе из строя одного из элементов, сохраняемость необходимых значений параметров системы в течение требуемого периода. *Коммуникативность* – существование сложной сети коммуникаций системы со средой. *Адаптивность* – стремление к состоянию динамической устойчивости системы путем адаптации параметров системы к изменяющимся параметрам внутренней и внешней среды. Напротив, *неустойчивость* не всегда губительна для системы, она может определять динамическое развитие системы.

Особо выделим такое важное свойство системы, особенно живой системы, как *гомеостаз*. Гомеостаз (др.-греч. ὁμοιοστάσις от ὁμοιος — одинаковый, подобный и στάσις — стояние, неподвижность; «сила устойчивости») — саморегуляция, способность открытой системы сохранять постоянство своего внутреннего состояния посредством скоординированных реакций, направленных на поддержание динамического равновесия.

Наконец, еще несколько важных общих свойств системы, не связанных с приведенной классификацией, но

необходимых для дальнейшего изложения. *Интегративность* - наличие системообразующих и системосохраняющих факторов. Необычное свойство - *эквивинальность* (одинаковый финал) – способность системы достигать определенного состояния независимо от исходного состояния/условий, поскольку это определяется только параметрами самой системы.

И, наконец, некоторые свойства биологических систем, которые часто встречаются – *порядок, самоорганизация, наследственность, развитие, эволюция* и проч.

Некоторые основные свойства живой системы. Прежде всего, это *компарментализация* (англ. *compartment* – отсек, отделение). Компарментализация означает, что клетка, как и всякая система, отгораживается от окружающей среды биологической мембраной. Более того, компарменты существуют внутри самой клетки, локализуя некоторые важные процессы от общей цитоплазмы; например, ядро с генетическим материалом, хлоропласты с фотосинтезом, митохондрии с синтезом АТФ (англ. аббревиатура аденозинтрифосфата). Важнейшее свойство живого - это *размножение*, например, делением клетки; это явление будем называть «жизнь».

Через весь курс лейтмотивом будет проходить удивительное свойство живых систем - *функциональная целесообразность*. В большинстве случаев, для любой молекулы в живой клетке можно задать по крайней мере два вопроса. Первый – почему в клетке именно эта молекула, а не какая-то другая; второй - что эта молекула делает в клетке, какова ее функция? Для неживой природы такие вопросы во многих случаях не имеют смысла.

Еще раз про *нелинейность* функционирования живого. Наше мышление стремится описать явление или систему в упрощенном виде, затем построить модель, используя линейную логику и простые причинно-следственные связи,

при этом избегая неопределенных и вероятностных событий. Такая первичная упрощенная модель неизбежно детерминирована и использует примитивную линейную бинарную логику: «да - нет». Современное изучение живых систем уже нельзя сводить к построению таких простых моделей, даже если они используют иерархии и подсистемы. Необходимо обязательно учитывать, что как наличие самих элементов, так и их взаимодействие носит вероятностный характер.

Соответствующий математический аппарат для описания подобных систем уже существует, например, «нечеткие множества». Для нечетких множеств понятие «множества» расширено допущением, что функция принадлежности элемента к множеству может принимать любые значения в интервале $[0...1]$, а не только 0 или 1, то есть, присутствует элемент или его нет.

Еще одна особенность современного развития методологии описания живого как сложной системы состоит в разработке биологических моделей нейронной сети. В простейшем случае искусственная нейронная сеть состоит из трех слоев. Обработка сигнала происходит с помощью множества взаимосвязанных элементов в этих слоях: входном, скрытом и выходном. В результате такой обработки между входными сигналами и выходным сигналом никогда не будет линейной корреляции, а результат будет определяться алгоритмами, по которым действует такая нейронная сеть.

Можно предположить, что в методологическом отношении системный взгляд на живое и жизнь находится в том же положении, что и физика в период перехода от принципов классического детерминизма к принципам неопределенности.

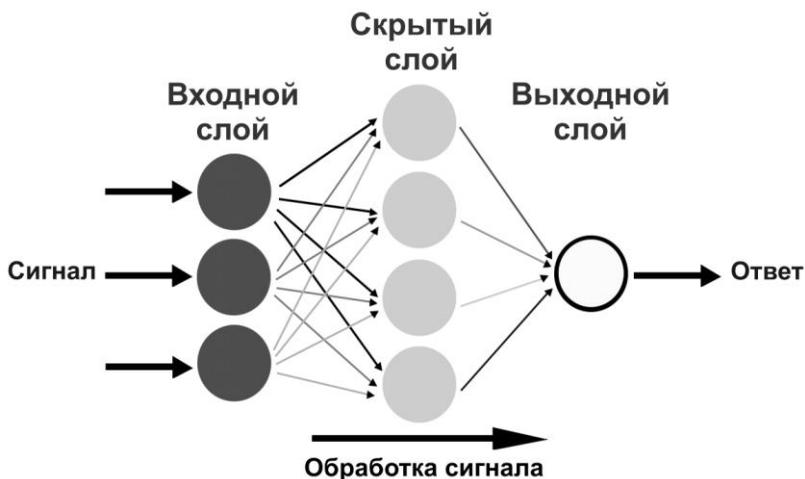


Рисунок 1.2. Организация нейронной сети. Сигнал об изменении в окружающей среде улавливается входным слоем нейронов и передается далее в скрытый слой. Скрытый слой анализирует полученный сигнал и передает измененный сигнал на выходной слой нейронов. Выходной слой дает интегральный ответ сети.

Разнообразие и системный закон Эшби. Развивая системный подход к описанию живого и жизни, следует принять во внимание еще одну закономерность - это закон необходимости разнообразия систем. В биологии этот закон можно применить к рассмотрению эволюции. Закон гласит: при создании проблеморазрешающей системы необходимо, чтобы эта система имела большее разнообразие, чем разнообразие решаемой проблемы, или была способна создать такое разнообразие. Система должна обладать возможностью изменять свое состояние в ответ на возмущение; разнообразие возмущений требует соответствующего разнообразия возможных состояний. В противном случае такая система не может отвечать задачам управления, выдвигаемым внешней средой, и будет мало-

эффективной. Отсутствие или недостаточность разнообразия могут свидетельствовать о нарушении целостности подсистем, составляющих данную систему.

Что такое живое и жизнь с точки зрения химии в рамках системного подхода?

Такие сложные понятия как *живое* и *жизнь* каждая из естественных и смежных наук рассматривает со своей точки зрения, поэтому полученные знания неизбежно будут фрагментарны (вспомните старинную притчу о слепых мудрецах и слоне).

В прикладной математике, например, кибернетика создает теорию самовоспроизводящихся автоматов; в физике – это явления *порядка и хаоса*; в химии – это свойства “биологических” молекул и их превращения; в биологии живое и жизнь являются предметом изучения самой науки (др. греч. *bios* – жизнь, *logos* - учение). Практически все ведущие ученые из каждой отрасли знаний задавались этими вопросами – что такое жизнь с точки зрения конкретной науки (см. список рекомендованной литературы); больше всего известны книги Э. Шредингера и Ф. Крика.

Химическая биология, как пограничная наука, должна оперировать основными понятиями обеих наук. В биологии - это многообразие, систематика, эволюция и клеточная теория. Основной функциональной единицей биологии (живого) является *клетка*. Химия изучает химическую (молекулярную) организацию клетки: ее состав - низкомолекулярные вещества и макромолекулы, основные принципы функционирования биологических молекул, связь между их структурой и функцией. Основной функциональной единицей химии является *атом или молекула*.

Термином “биологические молекулы” мы будем называть молекулы, которые входят в состав клетки. Биологические молекулы могут быть специфическими для живых организмов (как, например, белки и нуклеиновые кислоты), так и неспецифическими (встречаться и в неживой природе). Безусловно, этот термин обозначает конкретные химические соединения, никакого “витализма” за ним не стоит.

В рамках указанных границ между химией и биологией очень показателен вопрос о вирусах – является ли вирус живым? Это биологическая или химическая сущность? До сих пор этот вопрос разными авторами трактуется по-разному. Тем не менее, *вирус не является живым*, это химический супрамолекулярный комплекс (более подробный комментарий по этому вопросу будет дан после определения понятия *живой*).

От биологии к химии

Систематика разнообразных форм живого претерпевала изменения и уточнения по мере развития методов исследования. Когда основным инструментом наблюдения был глаз, то мы могли видеть только небольшую часть всего живого мира - многоклеточные организмы. Если границу видимости невооруженным глазом оценить в 70-80 мкм (прим 1/13 мм), то все объекты за пределами этой границы были невидимы. Только в XVIII веке, после изобретения микроскопа, был обнаружен новый мир – микроорганизмы. О существовании наиболее мелких объектов – вирусов, которые имеют отношение к живому, но сами не являются живыми, человек узнал на рубеже XIX и XX века.

Биология имеет дело с разнообразием живых организмов и их систематикой. На клеточном уровне мы также

сталкиваемся с колоссальным разнообразием клеток. Клетки сильно отличаются друг от друга по форме: сравните, например, клетки, которые вы хорошо знаете - продолговатые клетки стебля растения, круглые эритроциты крови. Клетки сильно отличаются друг от друга по линейным размерам, иногда в десятки раз. Один из самых маленьких микроорганизмов – это микоплазма, условный диаметр которой около 0,3 мкм. Клетка такого известного микроорганизма как кишечная палочка (*Escherichia coli*; *E. coli*) уже больше микоплазмы примерно в 7 раз, около 2 мкм; размеры эритроцита еще больше – 7 мкм. Одна из самых больших клеток – это куриный желток с условным диаметром прим 10 тыс. мкм (1 см). Самая длинная клетка – это нейрон кальмара длиной до 12 метров.

Но с точки зрения химии гораздо важнее рассматривать не линейные размеры клетки, а другой параметр – клеточный объем. Если аппроксимировать клетку шаром и принять за радиус 1 мкм (10^{-6} м, 10^{-5} дециметра), то объем клетки будет около $4 \cdot 10^{-15}$ л. Поскольку число молекул в 1 моле вещества (число Авогадро) примерно $6 \cdot 10^{23}$, то для того, чтобы иметь 1М концентрацию вещества в клетке, потребуется довольно малое число молекул ($6 \cdot 10^{23}$) \cdot ($4 \cdot 10^{-15}$) = $24 \cdot 10^8$ молекул, т.е. всего 2,4 млрд. молекул. Многие химические реакции протекают и при более низких концентрациях, например, 1 мкМ; тогда количество молекул на одну клетку будет составлять всего 2,4 тыс. Именно маленькие размеры клетки позволяют эффективно проводить химические реакции, оперируя ограниченным числом молекул; клетку можно рассматривать как миниатюрный химический реактор. Приведенные расчеты справедливы для бактерий, поскольку клетка бактерий представляет собой только один компартмент, который ограничен мембраной и не содержит внутренних перегородок.

По мере развития методов микроскопии удалось заглянуть внутрь клеток. Оказалось, что одноклеточные организмы разделяются на две группы: одни не содержали ядро, другие это ядро имели. Первый тип клеток назвали прокариоты (греч. *pro* — до, *karyon* – ядро), второй тип – эукариоты (греч. *eu* — хорошее, *karyon* – ядро). Прокариоты, как правило, являются одноклеточными (иногда они образуют колонии). Эукариоты тоже бывают одноклеточными (например, клетки дрожжей). К эукариотам относятся все клетки многоклеточных организмов (например, клетки человека).

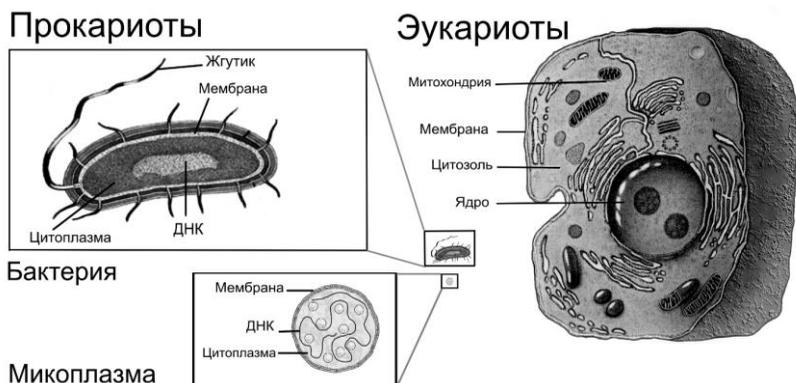


Рисунок 1.3. Организация и соотношение размеров прокариотических и эукариотических клеток. Для клеток прокариот приведены также масштабированные изображения. Клетки эукариот в десятки раз больше клеток прокариот и содержат компартменты: митохондрии, ядро и проч.

Линейные размеры клеток эукариот 10 -100 мкм, т.е. в десятки раз больше, чем размеры клеток прокариот. Если линейные размеры больше, например, в 10 раз, то объем

при этом становится больше в 1000 раз; т.е. чтобы сохранить рабочие концентрации веществ в клетке эукариот потребовалось бы на три порядка больше молекул. Поэтому не удивительно, что внутри клетки эукариот имеется несколько компартментов, размер которых сопоставим с размерами бактериальной клетки. В компартментах локализованы определенные целевые процессы. Так, клетки животных, кроме ядра, имеют еще митохондрии, которые занимаются преобразованием одних форм энергии в энергию пиррофосфатной связи. Митохондрий в клетке может быть много – несколько десятков или даже сотен; их размеры, в среднем, такие же, как и размеры бактерий: 0,5 – 1,0 мкм. У клеток растений добавляется еще один компартмент – хлоропласты, которые также отвечают за конверсию одних форм энергии в другие. Поскольку единственным источником энергии для живого, в основном, является солнце, то преобразование энергии кванта света в другие виды энергии в хлоропластах растений является чрезвычайно важным процессом. У растений размеры хлоропластов составляют 5 – 8 мкм.

Эндосимбиотическая гипотеза

Откуда появились такие внутриклеточные компартменты? Считается, что эукариоты появились около 1,5 млрд. лет назад; т.е. из 3,5 млрд. лет существования жизни на Земле эволюция потратила первую половину на создание и совершенствование прокариот; а вторую половину – на создание и совершенствование эукариот. Одна из доминирующих гипотез происхождения компартментов эукариот – это теория последовательной эндосимбиотии (или симбиогенеза; греч. σύν, *syn* - вместе, βίωσις, *biosis* живущий, и γένεσις, *genesis* происхождение); эндосимбионт – это клетка, которая без антагонизма живет внутри другой клетки.

Симбиогенез предполагает, что на первых этапах клеточной жизни существовали клетки-предшественники, прогеноты, которые дали происхождение всем трем ветвям эволюции. Одна из ветвей, т.н. археобактерии, попала в строго ограниченные экологические ниши (например, вулканы, солевые отложения) и эволюционировала довольно медленно, это отражено в их названии. Другая ветвь – зубактерии («истинные бактерии», не путать с эукариотами!) или просто бактерии – эволюционировала в современных представителей бактерий.

И, наконец, третья ветвь развилась в современные эукариоты, которые обособили свой генетический материал (ДНК) в ядре. На ранних этапах эволюции одна прогенота захватила другую, которая стала эндосимбионтом, способным выполнять функции ядра. Далее такая древняя клетка с ядром могла захватить прогеноты, способные выполнять окислительно-восстановительные реакции. Такой эндосимбионт дал начало эволюции митохондрий, которые сейчас осуществляют конверсию разных форм энергии для клетки-реципиента, клетки-хозяина.

Происхождение хлоропластов аналогично. Около 1,5 млрд. лет назад свободно живущие предки цианобактерий были захвачены древними эукариотами. И опять, новый внутриклеточный жилец оказался полезным, обеспечивая необходимые реакции фотосинтеза - превращения энергии кванта света в энергию пирофосфатной связи. Таким образом, компартментализация была очень важным фактором эволюции, который обеспечивал возможность скачкообразного усложнения системы живого от простой прогеноты к более сложной эукариотической системе путем использования специализированных отдельных компартментов, обеспечивая тем самым принципиально новое и более эффективное функционирование.

Живые организмы представляют собой сложные, динамические, открытые, саморегулирующиеся и самовоспроизводящиеся системы, в которых основные функции выполняют информационные макромолекулы - белки и нуклеиновые кислоты.

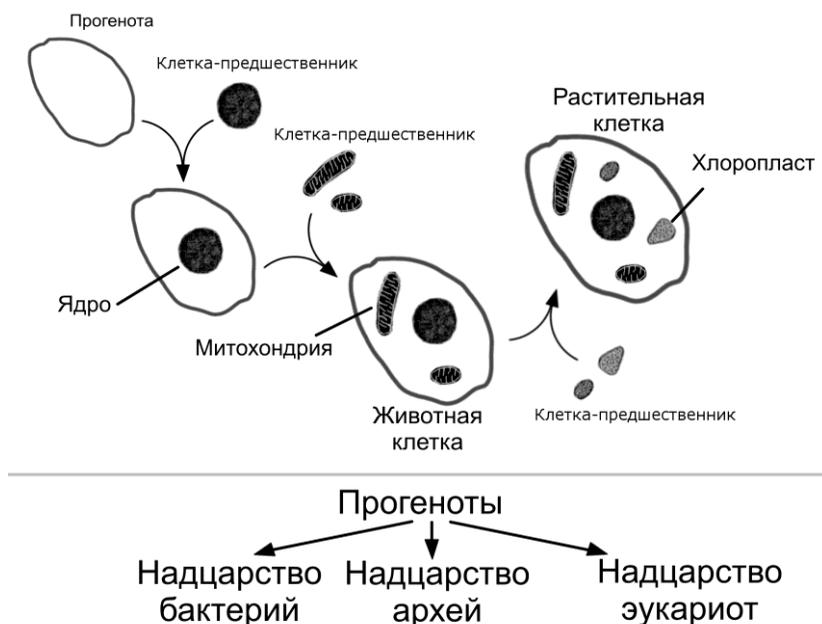


Рисунок 1.4. Эндосимбиотическая гипотеза: эукариотические клетки образовались в результате симбиоза отдельных клеток-предшественников.

Для живого характерен ряд совокупных признаков: гомеостаз, способность к воспроизведению (репродукции), трансформация энергии, метаболизм (обмен веществ), чувствительность, изменчивость. Совокупность этих признаков можно обнаружить уже на клеточном уровне. *Нет меньшей единицы живого, чем клетка.* Согласно определению, вирус не относится к живой системе – это сложный

супрамолекулярный химический комплекс, неспособный самостоятельно трансформировать разные формы энергии и самовоспроизводиться.

Клетка – это ограниченная активной мембраной сложная динамическая открытая система малых молекул и макромолекул, а также их супрамолекулярных комплексов, которые участвуют в единой совокупности энергетических и метаболических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

Глава 2

Молекулы и межмолекулярные взаимодействия в клетке

Типы химических взаимодействий в клетке

В биологии основной функциональной единицей является клетка, а в химии — это молекула/атом. Поэтому, переходя с уровня биологии (т.е. с клеточного уровня) на уровень химии (т.е. на субклеточный молекулярный уровень) химическая биология должна описать живое/клетку как химическую сложную систему, описать молекулы - элементы этой системы, описать взаимодействие этих молекул. Нам кажется удобным двигаться в обратном порядке - не разбирать клетку на молекулы, а собирать клетку из молекул.

Для начала повторим типы взаимодействий между молекулами. Химическое взаимодействие атомов/молекул бывает двух типов. *Ковалентные связи* — это химические связи, образованные за счет обобществления пары электронов. *Нековалентные взаимодействия* - "слабые" взаимодействия, не связанные с обобществлением пары электронов. Энергия разрыва нековалентного взаимодействия гораздо меньше, чем энергия разрыва ковалентной связи.

Какое место в химии живого занимают оба эти типа связей/взаимодействий? Почему в природе так активно используются нековалентные, или, как их еще называют, слабые взаимодействия?

Все эти вопросы подробно рассматриваются в курсах общей и неорганической химии; однако важность их правильного понимания для дальнейшего изложения курса ХОБП заслуживает того, чтобы еще раз подчеркнуть основные понятия и свойства.

Ковалентные связи

Образование и перераспределение ковалентных связей происходит при химических реакциях, в результате которых образуются новые комбинации атомов или новые молекулы с новыми свойствами. Для простейшей модели атома — ядро, окруженное электронами, введем понятие условного радиуса атома, который соответствует радиусу электронного облака при минимально допустимом контакте — так называемый *ван-дер-ваальсовый радиус*.

Голландская фамилия пишется Ван-дер-Ваальс; но ее словосочетания пишутся по-разному: сравните «уравнение Ван-дер-Ваальса», но «ван-дер-ваальсовы силы».

При сближении электронных облаков, принадлежащих двум атомам, они начинают отталкиваться, поскольку заряжены одноименно. Если отталкивание преодолено, то два атома могут объединиться в единую молекулу: электронные облака объединяются (обобществляются) в единую систему с двумя ядрами и между атомами образуется ковалентная связь. В этом процессе участвуют внешние валентные электроны двух атомов, поэтому и связь называется «ко-валентной» (совместно-валентной). При этом ядра атомов сближаются до такого расстояния, когда силы межъядерного отталкивания (одноименно положительные заряды отталкиваются) будут уравновешены силами притяжения ядер к заряду перекрывающихся электронов (разноименные заряды притягиваются). Равновесное расстояние между ядрами принимается за длину химической связи. Ковалентная связь в химических формулах обозначается черточкой.

Отметим еще один путь образования ковалентной связи путем объединения электронов: свободная пара электронов от одного атома (донора) обобществляется со вто-

рым положительно заряженным атомом с дефицитом электронов (акцептором). Этот процесс называется донорно-акцепторным переходом; название отражает не новый вид связи, а только путь образования ковалентной связи. Известный пример донорно-акцепторной ковалентной связи - образование положительно заряженного катиона аммония при взаимодействии аммиака (донора неподеленной пары электронов атома азота) с протоном (акцептором электронов).

Напомним три основных свойства химической связи: соблюдается *валентность* атомов, *направленность* связи (которая определяет пространственную геометрию молекулы) и *полярность* связи (различная электроотрицательность атомов смещает электронную плотность в сторону одного из атомов).

Ковалентная связь между атомами очень прочная, для разрыва связи нужно затратить много энергии, эта энергия называется *энергией связи*. Энергия ковалентной связи достигает нескольких сотен кДж/моль. Так, например, энергия связи между атомами углерода С-С в органических соединениях — прим. 350 кДж/моль, энергия связи С-О в спиртах тоже прим. 350 кДж/моль, а энергия связи О-Н в тех же спиртах намного больше – прим. 460 кДж/моль. В биологических макромолекулах также встречаются дисульфидные связи, обладающие энергией разрыва всего 251 кДж/моль (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. Энергии химических связей.

Связь между атомами	Энергия разрыва связи, кДж/моль
Ковалентные связи	
О-Н	461
Р-О	419
С-О	352
С-С	348
S-S	251
Нековалентные связи	
Ван-дер-ваальсовы силы	2-8
Водородная связь	8-21
Кулоновские силы	42

Нековалентные взаимодействия

Если атомы просто сближаются без объединения электронов на расстояния ван-дер-ваальсовых радиусов, то между ними могут возникнуть нековалентные взаимодействия. Различают три основных типа нековалентных взаимодействий.

1) *Кулоновские взаимодействия.* Два противоположно заряженных иона притягиваются по закону Кулона - энергия взаимодействия пропорциональна произведению зарядов и обратно пропорциональна квадрату расстояния между ними.

Закон Кулона:
$$F = k \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

Коэффициент пропорциональности называется *электрической постоянной* (ранее применяли термин «диэлектрическая постоянная»), она показывает, во сколько раз энергия взаимодействия в данной среде отличается от та-

ковой в вакууме. Энергия Кулоновских взаимодействий составляет около 40 кДж/моль (Таблица 2.1).

2) *Ван-дер-ваальсовы взаимодействия*. Энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий в 5-10 раз меньше, чем Кулоновских, и составляет 2-8 кДж/моль. Три типа ван-дер-ваальсовых взаимодействий перечислены по мере убывания энергии взаимодействия.

1. Взаимодействие *двух диполей*. Частичные заряды диполей меньше целочисленных зарядов, поэтому дипольные взаимодействия намного слабее кулоновских. 2. Взаимодействие *диполь - индуцированный диполь*; вторая молекула становится временным диполем в поле постоянного диполя первой молекулы. 3. Взаимодействие *двух индуцированных диполей*; сначала возникает первый диполь за счет флуктуации электронного облака, он генерирует поле, во второй молекуле индуцируется временный диполь.

3) *Водородная связь*. Название связи отражает ключевую роль атома водорода. Особый тип взаимодействий, в котором участвует атом водорода и два электроотрицательных атома, причем с одним них атом водорода связан ковалентно. В отличие от ковалентной связи, обозначаемой сплошной черточкой, водородная связь обозначается точками. Ковалентная связь электроотрицательного атома с водородом сильно поляризована и на водороде формируется частичный положительный заряд. Второй электроотрицательный атом – акцептор водорода, содержит неподеленную пару электронов, поэтому электростатически притягивается к частично положительному атому водорода, образуя нековалентную водородную связь.

Энергия водородной связи сильно зависит от природы атомов, которые ее образуют, ее значения находятся в интервале значений между энергией кулоновских взаимодействий и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, т.е. в диапазоне 8-20 кДж/моль. Очень существенное свойство водо-

родной связи – коллинеарность, т. е. все три атома должны располагаться на одной прямой; если атомы расположены под углом, то энергия связи будет убывать с учетом этого угла.

Электроотрицательные атомы расположены в верхнем правом секторе таблицы Д.И. Менделеева. В основном, мы будем иметь дело с водородными связями, образованными атомами кислорода и азота. Классическим примером является гидроксильная группа, атом водорода которой активно участвует в образовании водородной связи с другими электроотрицательными атомами, например, кислорода.



Интересно сравнить свойства воды и сероводорода. В таблице Менделеева сера находится в той же группе, что и кислород. Электроотрицательность серы (2,6) гораздо меньше, чем кислорода (3,5), атом серы не способен давать стабильную водородную связь.

Электроотрицательность приводится по шкале Оллреда-Рохова. Химия, М., Химия, 1989, с. 598.

Молекулы сероводорода друг с другом не связаны, именно поэтому при комнатной температуре сероводород существует в виде газа. В отличие от этого молекулы воды взаимодействуют друг с другом с образованием четырех водородных связей и вода при комнатной температуре — жидкость. Температуры кипения сероводорода и воды очень сильно различаются: -60°C против $+100^{\circ}\text{C}$, соответственно.

Сравним способность образовать водородную связь для атомов второго периода (Таблица 2.2). Фтор – очень

электроотрицательный атом и легко образует водородную связь, например, в ассоциатах фтористого водорода ($T_{\text{кип}} +19,5^{\circ}\text{C}$, сравните с хлористым водородом - $T_{\text{кип}} = - 85^{\circ}\text{C}$; электроотрицательность фтора — 4,1 и хлора - 2,8). Кислород рассмотрели чуть ранее на примере воды. Атом азота тоже достаточно электроотрицательный (3,1), поэтому можно говорить об ассоциатах аммиака ($T_{\text{кип}} = - 33^{\circ}\text{C}$). Более того, водородная связь, образованная атомами азота, играет ключевую роль в биологических макромолекулах: белках и нуклеиновых кислотах. Не будет сильным преувеличением сказать, что благодаря водородной связи между атомами азота в двуспиральной ДНК мы остаемся людьми - можем точно копировать и передавать наследственную информацию потомству (см. структуру комплементарных пар в главе о репликации ДНК). И, наконец, совсем очевидный факт - метан не может образовывать водородных связей, атом углерода имеет низкую электроотрицательность (2,5), поэтому метан - газ ($T_{\text{кип}} = - 164^{\circ}\text{C}$).

Таблица 2.2. Температуры кипения некоторых соединений водорода.

Соединение	Электроотрицательность атома	Температура кипения, °C
HF	4,1	19,5
H ₂ O	3,5	100
H ₃ N	3,1	-33
H ₄ C	2,5	-164
HCl	2,8	-85
H ₂ S	2,6	-60

Молекулы клетки

При обсуждении химического/молекулярного состава клетки следует прежде всего ответить на вопрос – корректно ли сравнивать молекулы и их свойства из разных

клеток и/или из разных организмов? На этот вопрос остроумный ответ дал нобелевский лауреат Жак Моно: «что справедливо для бактерии (кишечной палочки), то справедливо и для слона». Это можно сформулировать как принцип *единообразия структурной химии живого*. Исходя из постулата, что однотипные структуры должны выполнять однотипные функции, можно сформулировать принцип *единообразия функциональной химии живого*. Безусловно, что функционирование клеток прокариот (кишечная палочка) и клеток эукариот (слон) отличается. Тем не менее, можно выделить и сравнить основные базовые свойства для обоих типов клеток. Именно эта цель преследуется в данном курсе химической биологии.

Следуя принципу *целесообразности молекул живого*, ко всем биологическим молекулам можно «задавать» вопросы. *Зачем* эта молекула находится в клетке? Что она там делает, какова ее *функция*? Почему именно *эта* молекула, а не какая-нибудь другая? Почему данная молекула выполняет данную функцию в данный момент *времени*? Попытки системно ответить на все эти вопросы для цели, места и времени биологических молекул должны привести к созданию максимально приближенной *модели живого* с точки зрения химии.

Все молекулы, из которых построена и которые содержатся в живой клетке, можно разделить на два типа: низкомолекулярные соединения, или просто *молекулы*, и высокомолекулярные соединения, или *макромолекулы*. Такое разделение простое и удобное, но оно условно. Промежуточный тип соединений - олигомеры (греч. *oligos* — немногий); условно принято считать, что это фрагменты макромолекул, которые имеют порядка 20 повторяющихся звеньев.

В таблице 3 приведены количественные данные по молекулярному составу клеток. В весовом отношении низко-

молекулярные вещества составляют 3/4 веса клетки, а макромолекулы - 1/4.

Низкомолекулярные соединения, или просто *молекулы*, составляют примерно 75% клетки по весу (для кишечной палочки *Escherichia coli*, *E. coli*), из них 70% составляет вода, т.е. 93% всех низкомолекулярных соединений. Около 2% приходится на одну группу органических соединений — липиды, 3% приходятся на остальные органические и неорганические молекулы. Весовое содержание не коррелирует со степенью разнообразия молекул. Так, вода – это единственный тип молекул; липидов насчитывают около 20; различных неорганических ионов примерно столько же; остальные молекулы очень разнообразны – их более 500.

Таблица 2.3. Качественный и количественный состав бактериальной клетки (на примере *E. coli*).

	Массовая доля, %	Число разных типов однотипных соединений
Вода	70	1
Белки	15	3 000
Нуклеиновые кислоты: ДНК	1	1
РНК	6	> 3 000
Полисахариды	3	5
Липиды	2	20
Низкомолекулярные органические соединения	2	500
Неорганические ионы	1	20

Высокомолекулярные соединения, или макромолекулы, составляют примерно 25% клетки по весу (для кишечной палочки *Escherichia coli*). Из них информационные макромолекулы, белки и нуклеиновые кислоты, составляют 22% (около 88% макромолекул). Из них наибольший весовой процент имеют белки – 15%, а нуклеиновых кислот в два раза меньше – 7%: из них ДНК – 1% и РНК – около 6%. Остальные 3% приходятся на десяток полисахаридов.

Совершенно иная картина наблюдается, если рассматривать *разнообразие* информационных макромолекул. У бактерий очень много различных белков – более 3 тысяч; единственная ДНК – это бактериальная хромосома; основных видов молекул РНК тоже не очень много — в этом курсе мы рассмотрим матричные РНК (мРНК) и транспортные РНК (тРНК).

На современном этапе открываются все новые и новые разнообразные по функциям РНК, их известно более 3 тысяч («Мир РНК» постоянно расширяется).

В стандартных учебных программах изучение химии высокомолекулярных соединений, макромолекул, предусматривается после курса ХОБП. В связи с этим необходимо дать несколько основных определений, часть из которых есть уже в школьном курсе.

Иногда, нарушая номенклатуру, «макромолекулы» по старинке называют «полимерами». Термином полимер правильно называть вещество, которое состоит из макромолекул.

Макромолекулой будем называть химическое соединение, молекулы которого состоят из большого числа *повторяющихся звеньев* (или *структурных звеньев*, не путать с мономерами!). *Мономер* – это низкомолекулярное вещество, из которого реакцией полимеризации или поликонденсации получается макромолекула. *Поликонденсация* – это тип полимеризации, в результате которой образуются

макромолекулы с выделением низкомолекулярных соединений (например, воды). Если в полимеризации (поликонденсации) участвуют разные мономеры, то получается *сополимер*, структурное звено которого состоит из двух разных остатков.

Основные свойства природных/биологических информационных макромолекул следующие. Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и белки – это линейные неразветвленные асимметричные макромолекулы, которые получают поликонденсацией; это информационные макромолекулы, которые способны к самоорганизации и образованию уникальных динамических структур в пространстве.

Супрамолекулярные и макромолекулярные комплексы

Усложнение химических молекулярных систем происходит при переходе от отдельных молекул к надмолекулярным или супрамолекулярным комплексам, в которых участвуют либо отдельные молекулы, либо молекулярные ансамбли.

Более избирательные взаимодействия, для которых важна природа взаимодействующих атомов и их пространственное расположение, называют специфическими, они приводят к образованию супрамолекулярных комплексов.

Супрамолекулярная химия — раздел химии, который изучает свойства химических ансамблей, собранных из конечного числа молекул. Супрамолекулярные комплексы собираются за счет нековалентных взаимодействий и иногда фиксируются ковалентной связью. В круг явлений, изучаемых супрамолекулярной химией, входят самосборка межмолекулярных комплексов, конформационные переходы, образование пространственной структуры (фолдинг), молекулярное узнавание и проч.

Следует отличать агрегаты молекул от стехиометричных супрамолекулярных комплексов. Будем различать ассоциацию и агрегацию следующим образом.

*Ассоциация (лат. *assocciare*, соединять) — объединение ионов или простых молекул в более сложные. Ионные ассоциаты образуются за счет электростатических сил: два или три иона образуют нейтральные или заряженные частицы (см. теорию электролитической диссоциации). Ассоциаты молекул образуются за счет межмолекулярных сил; например, ассоциации молекул воды $(H_2O)_x$ за счет водородных связей. Ассоциация обратима: атомы/молекулы при ассоциации не меняются, диссоциация возвращает их в исходное состояние. Комплексы характеризуются константами ассоциации/диссоциации и энергией ассоциации/диссоциации.*

Агрегация — необратимый процесс, так как атомы/молекулы после агрегации изменяют свое состояние и степень свободы. Например, при денатурации белок агрегирует необратимо, для восстановления молекул белка в исходное состояние требуется не просто разбить молекулы белка, но и воздействовать на них специальным образом для ренатурации.

Классическим примером супрамолекулярного комплекса является комплекс краун-эфира с катионом металла (Рис. 2.1).

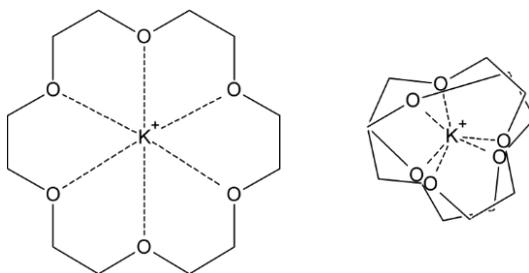


Рисунок 2.1. Комплекс 18-краун-6 эфира с катионом калия в двумерном (слева) и трехмерном (справа) представлении.

Таблица 2.4. Радиусы катионов щелочных металлов.

Катион	Радиус, нм
Li^+	0,068
Na^+	0,098
K^+	0,133
Rb^+	0,149

В супрамолекулярной химии две взаимодействующие молекулы имеют названия: большая - рецептор (ρ), меньшая - субстрат (σ). Селективность связывания субстрата σ рецептором ρ с образованием супермолекулы $\sigma\rho$ определяется «молекулярным узнаванием». Под молекулярным узнаванием будем понимать *специфическое взаимодействие молекул*, т. е. взаимодействие только с определенным партнером и ничем больше.

Иногда в сфере изучения супрамолекулярной химии включают и супрамолекулярные ансамбли — полимолекулярные ассоциаты, возникающие в результате спонтанной ассоциации неопределённо большого числа компонентов с образованием специфических упорядоченных структур: плёнка, слой, мембрана, везикула, мезоморфная фаза, кристалл и проч.

Кольцевая структура макроцикла составлена из эфирных групп, например, олигомеров этиленоксида с повторяющимся звеном $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$. Селективность к катиону с данным ионным радиусом определяется диаметром «короны», т. е. числом повторяющихся звеньев: например, 18-краун-6 (цикл из 18 атомов, 6 из которых кислороды) хорошо координирует катион калия K^+ , 15-краун-5 — катион натрия Na^+ , 12-краун-4 — катион лития Li^+ (ионные радиусы которых приведены в Табл. 4). Кислородные атомы эфирных групп располагаются в координационных сферах катиона, находящегося в центре крауна, периферия комплекса остается неполярной. Такой комплекс хорошо растворяется в органических растворителях, несмотря на наличие положительно заряженного катиона металла.

Таким образом, можно выстроить определенную иерархию молекулярной организации сложных химических систем, включая живые системы. Первый низший уровень - отдельные молекулы, далее идет уровень молекулярных комплексов, стабилизированных нековалентными взаимодействиями. На следующем уровне отдельные молекулы можно связать ковалентно с образованием олигомеров. Пространственная структура олигомеров может быть либо случайной и динамически изменяться (статистический клубок), либо быть определенной. На следующем уровне организации расположены макромолекулы, у которых отдельные звенья соединены ковалентно в длинные цепи. За счет этого макромолекулы образуют сложные пространственные структуры, часто эти структуры способны к динамическим изменениям при изменении условий внешней среды, так называемые *конформационные изменения*. И, наконец, макромолекулы могут нековалент-

но взаимодействовать друг с другом с образованием супрамакромолекулярных комплексов за счет феномена молекулярного узнавания.

Аналогичную иерархию супрамолекулярных комплексов можно наблюдать и для природных молекул. В этом случае мы проследуем от химии к биологии, от отдельных молекул к клетке.

Низкомолекулярные вещества либо сами, либо в виде повторяющихся структурных единиц макромолекул белков и нуклеиновых кислот представляют первый и самый низкий уровень сложности химической структурной организации клетки. На втором уровне располагаются сами макромолекулы. Супрамакромолекулярные комплексы белков и нуклеиновых кислот относят к третьему уровню сложности. И наконец – на самом последнем уровне находится сама клетка – системная единица живого.

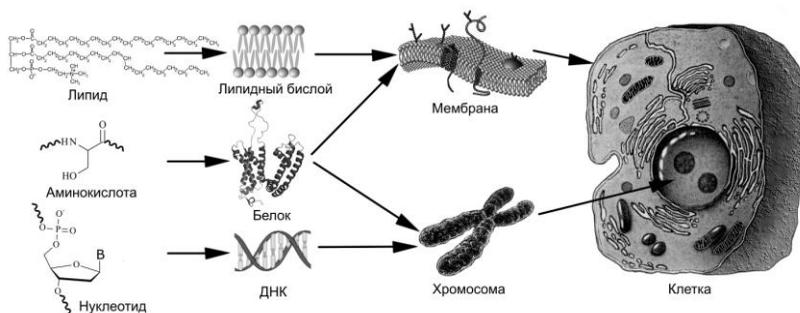


Рисунок 2.2. Уровни организации клетки. Липиды образуют липидный бислой за счет нековалентных взаимодействий. Аминокислотные остатки являются повторяющимся звеном белков, а нуклеотиды - ДНК и РНК. Белки и липидный бислой составляют мембрану. Белки и ДНК образуют хромосомы. Макромолекулярные комплексы объединяются в компартменты клетки.

Интересно, что формирование клеточной мембраны, которая ограничивает клетку от внешней среды, тоже связано со спонтанным образованием молекулярных ассоциатов, в которых молекулы связаны нековалентно.

После обсуждения общих вопросов приступим к более подробному изучению биологических молекул, их взаимодействию и функционированию.

Низкомолекулярные соединения

Вода, как структурообразующая среда

Постулат о функциональности химии живого позволяет нам задавать вопросы о целесообразности молекул, а именно: почему в построении и функционировании живой клетки участвуют именно эти молекулы? В чем их структурно-функциональная целесообразность? Начнем с низкомолекулярных соединений, а среди них - с самого распространенного, воды.

Несмотря на простоту химической структуры молекулы, вода является одним из самых загадочных по своему поведению химических соединений и химических веществ. К воде тоже можно адресовать вопрос о целесообразности ее структуры для системы живого, для клетки — почему именно вода является средой, в которой происходят молекулярные события в живой клетке? И ответ не менее интересен, чем свойства самой воды - вода является не просто неорганическим веществом или растворителем, в котором происходят клеточные процессы и реакции, вода выполняет *системообразующую* роль в клетке.

Именно поэтому при поиске внеземной жизни астрофизики ищут планеты с водой.

Для формирования сложной структуры клетки необходимо в небольшом объеме воды сконцентрировать множе-

ство молекул, что сопряжено с уменьшением энтропии, обеспечить правильную и эффективную сборку супрамолекулярных комплексов, обеспечить их функционирование. Все это связано с превращением химической энергии.

При комнатной температуре, в жидком состоянии молекулы воды формируют трехмерную матрицу, которая и обеспечивает системообразующую роль. Взаимодействие отдельных молекул воды с помощью водородных связей придает ассоциатам воды особую пространственную структуру. Этим вода отличается, скажем, от метана, который в жидком состоянии существует только при очень низких температурах; между молекулами метана водородная связь не образуется.

При комнатной температуре вода существует в виде жидкости; $T_{\text{кип}}$ воды очень высокая: $+100^{\circ}\text{C}$. В жидкой фазе все молекулы воды нековалентно взаимодействуют друг с другом с помощью водородной связи. Чтобы нарушить эти взаимодействия и разрешить молекуле покинуть водную фазу и перейти в газовую фазу нужно потратить довольно много энергии.

Структура воды в жидкой фазе представляет собой трехмерную сетку межмолекулярных взаимодействий, в которой каждая молекула воды связана водородной связью с четырьмя другими молекулами воды. В молекуле воды два атома водорода - это доноры водородной связи, а атом кислорода - акцептор. Поскольку атом кислорода имеет две неподеленные пары электронов, то он акцептирует два водородных донора - итого получается четыре водородные связи (Рисунок 2.3).

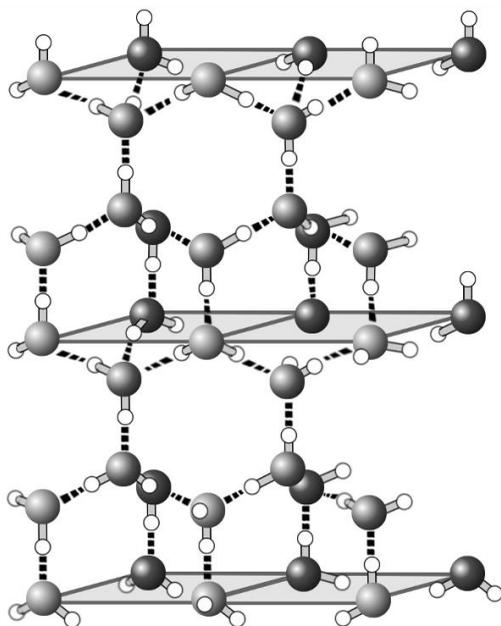


Рисунок 2.3. Пространственная структура ассоциатов воды. Ковалентные связи обозначены сплошными линиями, водородные связи - штрихами. Некоторые атомы кислорода соединены в плоскости для наглядности способа упаковки молекул.

*Для льда характерна более рыхлая структура молекулярных кластеров. Процесс упаковки молекул в гексагональную кристаллическую структуру доминирует над межмолекулярными взаимодействиями в растворе, поэтому в кристалле каждая молекула образует, в среднем, менее четырех водородных связей (т. е. альтернирующие три и четыре; лат. *alterno* — чередоваться). Поэтому лед имеет более рыхлую структуру, его удельный вес ниже жидкой воды, поэтому он плавает на поверхности.*

Что происходит, когда вещество попадает в воду? Как получаются водные растворы? Этот процесс зависит от природы растворяемого вещества. Разберем четыре примера для четырех разных типов соединений/молекул: ионных, гидрофильных, гидрофобных и амфифильных.

1) *Ионные соединения* хорошо растворяются в воде, при этом происходит электролитическая диссоциация. Из неорганической химии известно, что при растворении твердой поваренной соли NaCl в воде происходит диссоциация на ионы Na^+ и Cl^- , поскольку в процессе растворения каждый из ионов взаимодействует с молекулами воды, которые формируют гидратную оболочку (Рисунок 2.4). Энергия гидратации больше, чем кулоновская энергия взаимодействия ионов.

2) *Гидрофильные молекулы* хорошо растворяются в воде, поэтому их так и называют (др. греч. ὕδωρ — вода, φιλεῖν — любить). Например, низшие спирты (метанол, этанол) смешиваются с водой в любых соотношениях; более того, при растворении выделяется тепло. Конечно, при этом происходит образование водородных связей (Рисунок 2.4), поскольку спирт своей гидроксильной группой имитирует молекулу воды и хорошо встраивается в существующую сетку водородных связей воды.

Небольшой углеводородный остаток расталкивает молекулы воды в упорядоченной трехмерной сетке, но это возмущение незначительно.

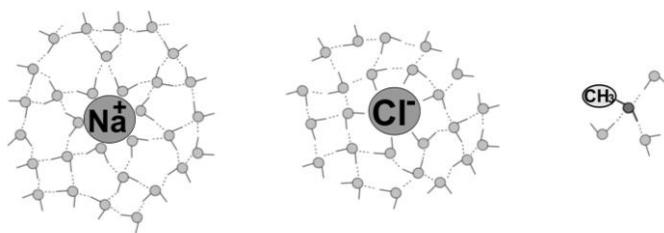


Рисунок 2.4. Гидратация ионов - Na^+ и Cl^- , а также гидрофильного соединения - метанола. Пунктиром обозначены водородные связи.

3) *Гидрофобные молекулы* плохо растворяются в воде, поэтому так и называются (др.-греч. ὕδωρ — вода, φόβος — страх) - гидрофобные молекулы неполярны и стараются избежать контакта с водой. Попадая в воду, они стремятся минимизировать площадь контакта с ней и распределиться на границе фаз. Напротив, гидрофобные молекулы хорошо растворяются в неполярных растворителях («подобное в подобном»);

4) *Амфифильные молекулы* — это молекулы, в структуре которых есть как гидрофильные, так и гидрофобные фрагменты (греч. *amphi* - двоякий). Когда амфифильные молекулы попадают в воду, наблюдаются т. н. *гидрофобные эффекты*.

 Часто эти явления неправильно называют «гидрофобными взаимодействиями». Из дальнейшего изложения станет ясно, что таких взаимодействий не существует.

Разберем гидрофобные эффекты на примере поведения стеарата натрия, $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$, в воде. Эта молекула является типичным представителем т. н. ПАВов — поверхностно-активных веществ; к ним относится мыло, которое

было известно еще в древнем Шумере и Вавилоне около 2 800 лет до н. э. При попадании в воду происходит гидратация гидрофильной группы остатка карбоновой кислоты и ее диссоциация (т.н. «головка» молекулы), а длинный углеводородный остаток (т.н. «хвост») расталкивает молекулы воды с нарушением водородных связей в сетке взаимодействий; процесс затратный и энергетически невыгодный (Рисунок 2.5). Степень нарушения трехмерной структуры воды определяется площадью поверхности гидрофобной части молекулы. При попадании второй молекулы стеарата в воду с ней происходит то же самое.

Когда две молекулы стеарата окажутся рядом, бок о бок, то объединенная площадь гидрофобной поверхности двух соседних молекул будет меньше, чем сумма площадей для двух отдельных молекул. Поэтому процесс сближения молекул и выталкивания молекул воды из межмолекулярного пространства между стеаратами становится энергетически выгодным.

Форму молекулы стеарата можно аппроксимировать конусом с карбоксильной группой в основании. При повышении концентрации стеарата все больше и больше молекул будут сближаться своими гидрофобными хвостами и в конце концов (по достижении критической концентрации мицеллообразования) образуют шар, внутри которого будут гидрофобные хвосты, а на поверхности — гидрофильные головки ионизированных карбоксильных групп. Такой шар называется мицеллой (лат. *mica* — частица, крупинка).

Рассмотрим еще один пример гидрофобных эффектов, которые возникают при попадании молекул фенола в воду. Два бензольных кольца располагаются друг над другом в стопку, что дает минимальную площадь поверхности такого димера.

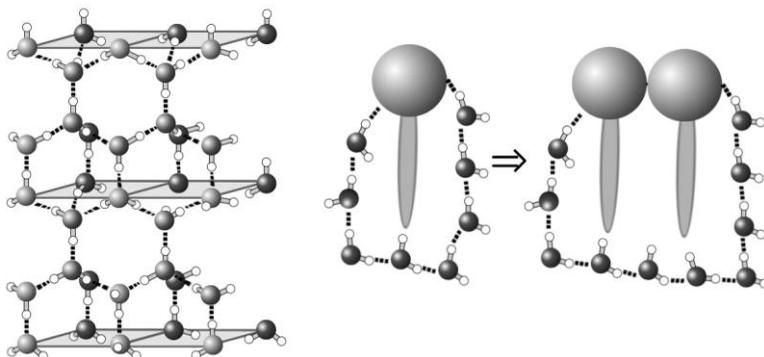


Рисунок 2.5. Гидрофобные эффекты при взаимодействии ассоциатов воды с амфифильными соединениями (на примере стеарата, $C_{17}H_{35}COO^-$). Гидрофильная "головка" стеарата образует водородные связи с молекулами воды, а гидрофобный "хвост" - нет. "Хвосты" стремятся объединиться в единую структуру, уменьшая площадь контакта с водой.

В данном случае для описания параллельной ориентации двух плоских ароматических циклов один над другим, используют специальный термин - «стэкинг-взаимодействия» (англ. *stack* – стопка). Поскольку π -электроны ароматических систем взаимно поляризуются, в данном случае возникают дополнительные взаимодействия, которые относятся к классу ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

Все описанные эффекты комплексообразования и самоорганизации молекул могут происходить только благодаря существованию трехмерной сетки водородных связей в воде. Еще раз подчеркнем, что вода является не просто полярным растворителем, а играет особую системообразующую роль в организации биологических молекул в клетке.

Липиды

По содержанию в клетке следующими после молекул воды идут липиды. Среди многих низкомолекулярных соединений в клетке липиды следует выделить особо. И не только потому, что липидов в клетке много, но и потому, что они являют собой яркий пример молекул, способных к самоорганизации в воде в различные надмолекулярные структуры: мицеллы, бислои, липосомы. Например, липидный бислой образует динамические границы раздела среда — клетка, ограничивает компартменты внутри клетки. Это не просто границы раздела — это активные структуры, «двумерная матрица», в которой другие молекулы, например, белки формируют функциональные супрамолекулярные комплексы.

Трудность в изучении липидов в том, что они не принадлежат к определенному классу органических соединений, таких как алканы, спирты, кислоты и проч. Это название объединяет очень разнородные органические соединения (*липиды*, греч. *lipos* — жир).

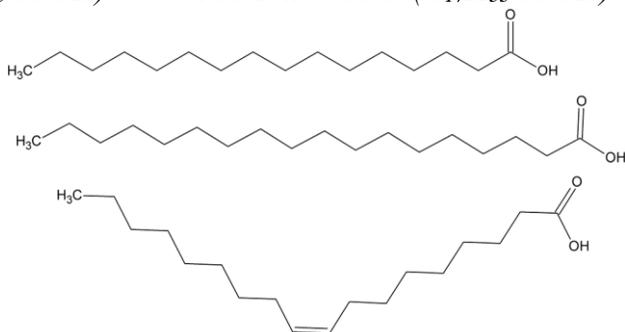
Липиды - это растворимые в неполярных растворителях и не растворимые (или плохо растворимые) в воде низкомолекулярные органические соединения, в том числе жиры, стеринны и изопреноиды.

В курсе ХОБП мы рассмотрим представителей всех трех групп липидов. Жиры, триглицериды жирных кислот, известны из школьного курса. К соединениям второй группы относится холестерин. И, наконец, каротин, который входит в состав моркови, — это яркий пример соединений третьей группы.

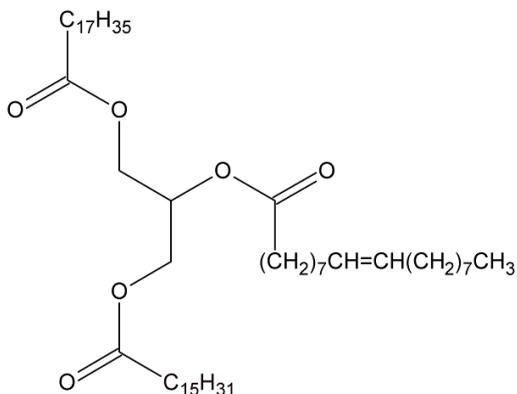
Триглицериды жирных кислот – это сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и органических жирных кислот, которые могут быть предельными и непредельными.

Самая известная предельная жирная кислота - это стеариновая кислота (октадекановая кислота) – $C_{17}H_{35}COOH$. Непредельная жирная кислота с таким же количеством атомов углерода – это олеиновая кислота (цис-9-октадеценная кислота) – $C_{17}H_{33}COOH$. Тривиальные названия кислот произошли от источников их выделения (греч. *stéar* – жир; лат. *oleum* - масло, оливковое).

Наиболее распространенные жирные кислоты (сверху вниз): пальмитиновая ($C_{15}H_{31}COOH$), стеариновая ($C_{17}H_{35}COOH$) и олеиновая кислоты ($C_{17}H_{33}COOH$):



Триглицерид, содержащий три разных остатка жирных кислот:



В молекулах предельных жиров, т.е. содержащих остатки предельных кислот, углеводородные радикалы расположены параллельно друг другу; триглицериды могут упаковаться плотно, бок о бок, поэтому при обычных условиях предельные жиры – это твердые вещества. У непредельных жирных кислот двойные связи определяют излом равномерного хода углеводородной цепи за счет цис-или транс-изомерии при двойной связи; параллельная укладка длинных углеводородных радикалов становится невозможной, поэтому при обычных условиях непредельные жиры – это жидкости, их называют маслами.

Давайте попробуем из жира, который очень гидрофобный, сделать липид, который будет обладать амфифильными свойствами? Для этого необходимо, как минимум, заменить один из остатков кислоты на очень полярную группу. Пусть триглицерид будет сложным эфиром одной предельной жирной кислоты, еще одна сложноэфирная связь будет принадлежать непредельной жирной кислоте, а третий гидроксил глицерина можно модифицировать каким-либо очень полярным остатком, что компенсирует гидрофобность остальной части молекулы. Лучше всего на эту роль подходит сильная многоосновная неорганическая кислота, природа выбрала трехосновную фосфорную кислоту.

Почему не подходит двухосновная серная кислота или четырехосновная кремниевая кислота, рассмотрите самостоятельно.

Полученный триэфир называется *фосфолипидом*. Он обладает двумя участками: гидрофобным «хвостом» (состоящим из двух радикалов карбоновых кислот) и гидрофильную заряженную «головку» (этот зооморфизм часто используется в литературе).

Липидный бислой

Образование липидного бислоя в воде — яркий пример самоорганизации молекул в надмолекулярные комплексы. Формирование липидного бислоя в воде представляет собой один из самых ярких и элегантных примеров самоорганизации сложных систем из достаточно простых молекул с малой молекулярной массой.

Мысленно представим себе, что произойдет, когда молекула амфифильного фосфолипида попадает в воду. За счет гидрофобного эффекта длинные углеводородные радикалы жирных кислот укладываются бок о бок; при этом все гидрофильные головки ориентируются в одну сторону.

Напомним, что в пространстве форму длинной жирной кислоты можно аппроксимировать конусом, что определяет форму мицелл. Фосфолипид содержит два остатка кислоты, и его форма в пространстве аппроксимируется цилиндром. Благодаря этому молекулы фосфолипида могут уложиться в слой.

Таким образом, в нашем мысленном эксперименте, на первом этапе молекулы фосфолипида в воде формируют псевдо-двумерный монослой однотипно ориентированных молекул.

Поперечная гибкость такого монослоя будет зависеть от количества непредельных углеводородных радикалов, которые слегка «разрыхляют» плотнейшую упаковку.

Толщина липидного монослоя находится в нанометровом диапазоне. Она складывается из длины углеводородного радикала, плюс длины сложноэфирных связей, плюс размеров остатка глицерина. Одна поверхность предполагаемого монослоя будет полностью гидрофобной, а другая

– полностью гидрофильной, ионизованной. Конечно, такая надмолекулярная наноконструкция может образоваться только в мысленном эксперименте, поскольку в реальных условиях, в воде, две гидрофобные поверхности двух монослоев немедленно «уйдут из воды» и схлопнутся за счет гидрофобного эффекта, сформируется бислой с двумя гидрофильными поверхностями. Бислой можно назвать двумерным, поскольку его толщина неизмеримо меньше его линейных размеров.

Формирование бислоя происходит спонтанно, согласно всем законам термодинамики. Это очень яркий пример самоорганизации молекул в надмолекулярные сложные структуры, которые образуются в воде благодаря ее системобразующим свойствам.

Целенаправленный дизайн структуры молекул, которые способны самособираться в надмолекулярные структуры, - одно из развивающихся перспективных направлений нанобионауки и нанобиотехнологии.

Полученная в мысленном эксперименте конструкция липидного бислоя будет мало стабильна в воде, поскольку торцы бислоя гидрофобны. Чтобы «спрятать от воды» торцы плоского бислоя, он замкнется в сферу, которая будет иметь полость с водой; внутренняя и внешняя поверхности бислойной сферы будут гидрофильными. Такие частицы называются *липосомами*. Липосомы следует отличать от мицелл, последние не имеют внутри полости (Рисунок 2.6).

И, наконец, решим еще одну проблему для липидного бислоя. В нашем мысленном эксперименте все головки фосфолипидов были ориентированы в одну сторону и поэтому на обеих поверхностях бислоя находились отрицательно заряженные фосфатные группы. Это создает

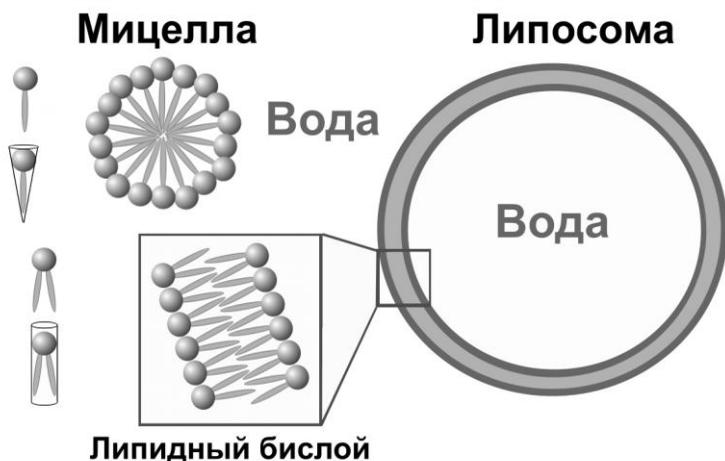


Рисунок 2.6. Образование межмолекулярных ассоциатов из амфифильных соединений. Молекула ПАВ аппроксимируется конусом, такие частицы образуют мицеллы в водных растворах за счет гидрофобного эффекта. Молекула фосфолипида аппроксимируется цилиндром, такие частицы в водных растворах образуют бислой, который замыкается с образованием липосом.

определенную напряженность в структуре бислоя, поскольку одноименные заряды отталкиваются.

Для нейтрализации фосфата в фосфолипид необходимо ввести положительно заряженную функциональную группу; самая простая и эффективная группа - это аммоний-катион, например, в виде первичного амина. Если остаток фосфорной кислоты фосфолипида этерифицировать гидроксильной группой этаноламина, то получится *фосфатидилэтаноламин*. Для получения постоянного положительного заряда, аминокгруппа превращена в четвертичную аммониевую соль введением трех метильных групп (кватернизована). Таким образом, получается произ

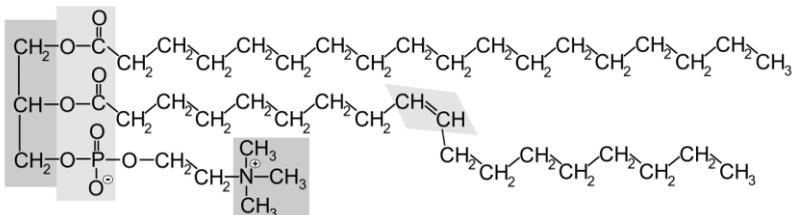


Рисунок 2.7. Фосфатидилхолин.

водное фосфолипида, которое называется *фосфатидилхолин* (Рис. 2.7).

Подвижность липидов в бислое. Молекулы липидов удерживаются в бислое только за счет гидрофобного эффекта и между ними есть только ван-дер-ваальсовы (дисперсионные) взаимодействия. Поэтому неудивительно, что, несмотря на плотную упаковку бок о бок, за счет теплового движения отдельные молекулы липидов могут меняться местами с соседями, обеспечивая тем самым перемещение липидов друг относительно друга в пределах бислоя. Этот феномен называется *латеральная диффузия* (лат. *laterālis* - боковой).

Подвижность липидов в бислое делает возможным перегруппировку бислоев. Например, две липосомы могут сливаться и тогда их содержимое объединяется. Молекулярный механизм слияния бислоев в деталях неясен, однако предполагается следующее. Допустим два бислоя располагаются один над другим. Сначала бислои сближаются, на этом участке происходит дестабилизация их структуры, затем в месте контакта происходит перегруппировка липидов таким образом, что формируется пора путем замыкания части верхнего бислоя на часть нижнего бислоя. Дестабилизировать структуру бислоя для облегчения слияния можно ПАВами.

Слияние мембран играет важную роль в клетках эукариот, поскольку они содержат много компартментов. Про-

никновение вирусов в клетку происходит также благодаря слиянию мембран (например, вирус иммунодефицита человека). Обратный процесс также очень важен для жизни клетки. При делении клетка делится на две дочерние, каждая из которых окружена бислоем, при этом распределение содержимого исходной клетки происходит без потерь. Вирус иммунодефицита человека уходит из клетки, «одеваясь» клеточной мембраной и диссоциируя от клетки.

Глава 3

Макромолекулы клетки. Белки

В предыдущей главе было показано, что в определенных условиях молекулы способны спонтанно формировать сложные надмолекулярные (супрамолекулярные) структуры, которые сохраняются как единое целое без участия ковалентных связей: либо за счет нековалентных взаимодействий, либо за счет гидрофобного эффекта. Принципиально иную важную группу химических соединений клетки представляют собой высокомолекулярные соединения или макромолекулы. В этом случае макромолекула как единое целое сохраняется за счет ковалентных связей между молекулами; другими словами, «упаковка» отдельных молекул достигает своего предела. В курсе ХОБП мы рассмотрим, прежде всего, белки и нуклеиновые кислоты - макромолекулы, которые обеспечивают в клетке информационные потоки за счет своих уникальных и удивительных свойств. Начнем с самых представленных в клетке макромолекул — белков.

Белки. Протеом

Белки составляют основную массу макромолекул в клетке — 15% (весовых), против 7% для нуклеиновых кислот. Совокупность всех белков клетки называется *протеом*.

Протеом - это своего рода «белковый портрет» клетки; например, в бактериальных клетках обнаруживают до нескольких тысяч различных белков. Набор белков определяется типом клеток (из тканей печени, мозга, сердца), а также физиологическим состоянием клетки в данный момент времени.

Функции белков чрезвычайно многообразны. Практически в каждой главе мы будем разбирать какую-либо

функцию белка. Самую известную функцию белка — катализ, выполняют ферменты. Белки формируют строительные модули клетки: например, в построении трехмерной сетки

Развитие системной биологии привело к появлению понятий «омики» (англ. omics). Если рассматривается вся совокупность объектов или явлений, то к окончанию названия прибавляется частица «-ом». Например, липидом, протеом; транскриптом, метаболом и проч.

Протеин (греч. протос — первый, первичный) — старое тривиальное название белка, предложенное Берцелиусом. Корень этого термина входит в состав современных терминов, например, протеолиз (гидролиз белка) протеинкиназа.

цитоскелета участвуют микрофиламенты, по которым передвигаются миозиновые белковые молекулярные моторы (больше известные по их роли в мышечном сокращении). Белки обеспечивают приобретенный иммунитет организма путем специфического взаимодействия иммуноглобулинов (антител) с чужеродным агентом. Белки участвуют в системе передачи сигнала из клеточного окружения в клетку: рецепция различных лигандов, например, факторов роста клеток и проч., часто сами лиганды также являются белками, например, факторы роста. Белки обеспечивают транспорт веществ через клеточные мембраны, формируя трансмембранные каналы. Узнавая определенные участки ДНК, белки регулируют экспрессию генов, и многие другие процессы. И, наконец, белки обеспечивают резерв организма в аминокислотах, например, овальбумин яйца, казеин молока и проч. Именно в силу такого колоссального разнообразия структур и функций

белка философы XIX века определяли «жизнь как способ существования белковых тел».

Уровни структуры белка

Белки – это линейные (неразветвленные) асимметричные макромолекулы, которые получаются реакцией поликонденсации производных аминокислот. Белки – информационные макромолекулы, информация записана в их первичной структуре в виде последовательности аминокислот (как текст записан с помощью алфавита из 20 букв/аминокислот). Белки способны формировать уникальную пространственную структуру, которая определяется их первичной структурой.

Выделяют несколько уровней структурной организации белка (Рис. 3.1).

Первый уровень структуры белка - это *химическая структура* макромолекулы: остатки аминокислот, соединенные амидной связью, в случае белков называемой «пептидной» связью.

Раньше в определение термина «первичная структура» включали и тип химической связи, и информацию, например, «последовательность аминокислот, соединенных пептидной связью». В процессе накопления колоссального массива данных по первичным структурам и возникновением биоинформатики для анализа баз данных, появилась необходимость разделить и конкретизировать термины. В данном курсе ХОБП понятие «первичная структура» имеет только информационное содержание - это «последовательность аминокислот», в отличие от химической структуры белка - это «остатки аминокислот, соединенных пептидной связью».

Следующий уровень структуры белка – это *вторичная структура*: локальная структура полипептидной цепи; к ней относится β -структура и α -спираль. Расположение всех атомов белка в пространстве называется *третичной структурой*. *Четвертичная структура* белка – это белковые супрамакромолекулярные комплексы; например, при взаимодействии белка с другим белком (или белками) образуется мультисубъединичный комплекс.

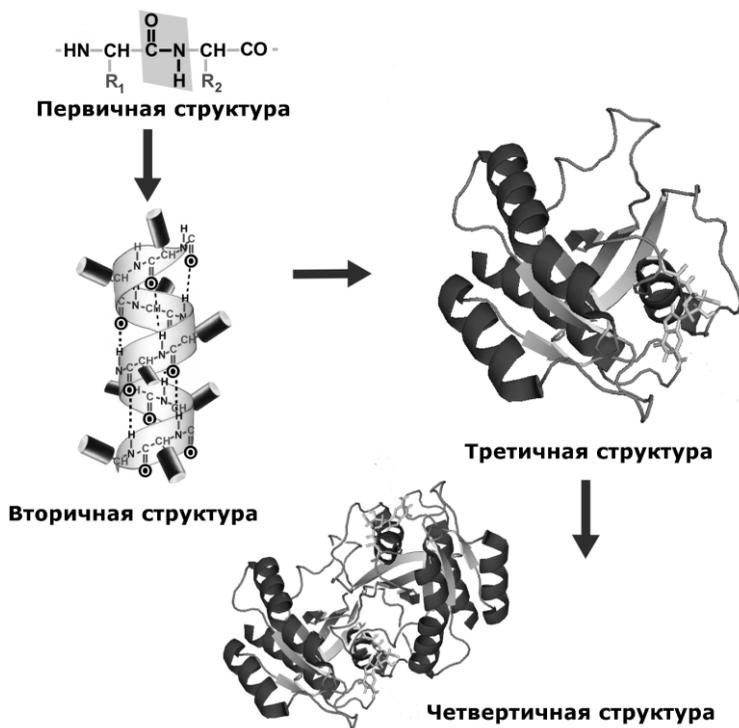


Рисунок 3.1. Уровни структурной организации белков: первичная структура - аминокислоты, соединенные пептидными связями, вторичная - элементы укладки остова, третичная - взаимное расположение атомов в пространстве, четвертичная - комплекс нескольких молекул.

Аминокислоты

Макромолекулы белка построены из остатков 20 различных аминокислот (АК); точнее α -аминокислот; «альфа» означает, что аминогруппа находится у α -углеродного атома карбоновой кислоты (Рис. 3.2). В силу многих причин, которые не раз будут указаны далее, структурную формулу АК следует всегда писать однотипно: аминогруппа пишется слева и карбоксильная группа — справа; т. е. так, как это прямо следует из названия *амино-кислота*. У α -углеродного атома находится еще один заместитель — R, который определяет химическую индивидуальность каждой из 20 АК.

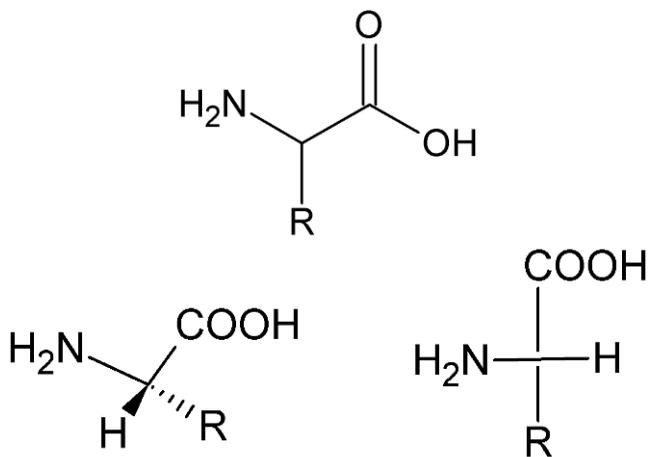


Рисунок 3.2. Двумерное (слева), пространственное (посередине) изображение L-аминокислот и проекция Фишера (справа). Вытянутые треугольники (сплошные или штрихованные) для указания атомов, которые выходят из плоскости.

В данном курсе не рассматривается пространственная изомерия аминокислот.

До последнего времени сокращенные названия АК записывались латиницей по первым трем буквам полного названия: например, глицин – Gly. Для компьютерного анализа белковых структур используют однобуквенные обозначения: например, глицин – G. Для АК с одинаковыми первыми буквами используют вторую, третью или другую букву: например, фенилаланин (Phe) обозначается F, поскольку P уже принадлежит пролину (Pro, P); тирозин (Tyr) обозначается как Y, поскольку T уже принадлежит треонину (Thr, T); аспарагин (Asn) обозначается как N, поскольку A уже принадлежит аланину (Ala, A); аспарагиновая кислота (Asp) обозначается как D, поскольку все буквы ее названия использованы (Рис. 3.3).

Химическая структура АК отличается только природой бокового радикала. По его свойствам все АК можно группировать различными способами. Однако любая классификация будет условной, поскольку некоторые АК обладают множественными свойствами (плейотропными свойствами; греч. *pleion* — больше, *tropos* — превращать). Яркий пример – это тирозин (Tyr, Y) – ароматический боковой радикал которого содержит гидроксил, который, как у фенола, проявляет кислотные свойства (ср. карболовая кислота).

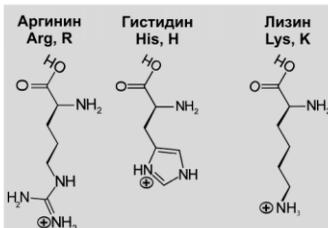
Формулы аминокислот приведены на Рис. 3.3. Разберем здесь природу боковых радикалов подробнее. У трех АК боковые радикалы положительно заряжены за счет протонирования атома азота. У лизина (Lys, K) протонируется первичный амин, у аргинина (Arg, R) - это гуанидино-группа.

I. Заряженные аминокислоты

I.1. Кислые



I.2. Основные

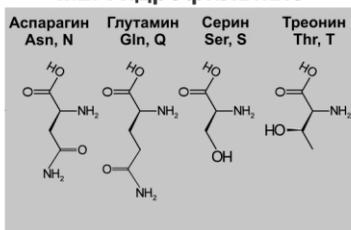


II. Незаряженные аминокислоты

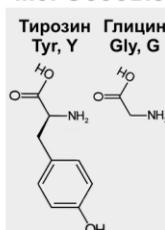
II.1. Гидрофобные



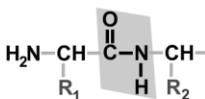
II.2. Гидрофильные



II.3. Особые

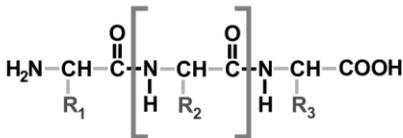


Дипептид



пептидная
связь

Трипептид



повторяющееся
звено

Рисунок 3.3. Классификация аминокислот по природе бокового радикала. Пептидная связь (внизу слева) и повторяющееся звено белка (внизу справа).

Гуанидин – это молекула с атомом углерода с двумя аминогруппами и одной иминогруппой. Структура легко протонируется, приобретая заряд +1.

И, наконец, радикал гистидина (His, H) – это β -имидазоллил. His протонируется по азоту в третьем положении имидазола (Im), поскольку азот в первом положении обеспечивает ароматичность гетероцикла.

Радикалы двух АК заряжены отрицательно, поскольку содержат карбоксильные группы: аспарагиновая кислота (Asp, D) и глутаминовая кислота (Glu, E).

Среди незаряженных аминокислот выделим группу аминокислот с гидрофобным боковым радикалом: алифатическим (аланин (Ala, A), валин (Val, V), лейцин (Leu, L), изолейцин (Ile, I) или ароматическим (фенилаланин (Phe, F), триптофан (Trp, W)). Боковой радикал метионина (Met, M) алифатический и содержит двузамещенный атом серы. Необычна структура циклической АК пролина (Pro, P); алифатический радикал замкнут на α -аминогруппе, образуя пятичленный цикл, что не мешает аминокислоте образовывать пептидные связи, но налагает ограничения на подвижность бокового радикала.

Глицин (Gly, G) имеет в качестве бокового радикала атом водорода, эта аминокислота отнесена к особым, поскольку не проявляет выраженных свойств, позволяющих отнести ее к гидрофобным или полярным группам. Как уже было упомянуто, к особым также отнесен тирозин (Tyr, Y).

Полярные незаряженные радикалы содержат гидроксильную (серин (Ser, S) и треонин (Thr, T)), тиоловую (цистеин (Cys, C)) или амидную группы (аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q)). Боковые радикалы этих аминокислот способны образовывать водородные связи.

Первичная структура белка

Повторяющееся звено макромолекулы белка (не путать с термином *мономер!*) – это остаток АК, который ковалентно соединен с другим аминокислотным остатком амидной связью; для белка *амидная связь* называется *пептидной связью*. Поскольку структура самой АК асимметрична, то полипептидная цепь тоже асимметрична: полипептид принято писать слева направо от концевой аминокислотной группы первой АК до концевой карбоксильной группы последней АК; концы белка обозначаются как N-конец (левый) и C-конец (правый), соответственно.

Химический синтез пептидов не так прост, как кажется. Если просто смешать в растворе две АК (АК1 + АК2), то пептидная связь не образуется (эта реакция часто приводится в учебниках). Чтобы неподеленная пара электронов атома азота АК2 атаковала атом углерода карбоксильной группы АК1 (имеет частично положительный заряд), необходимо этот атом углерода активировать, т.е. еще больше оттянуть от него электроны и внести "хорошую" уходящую группу; для этого достаточно превратить карбоксил в сложный эфир.

И действительно, при гидролизе гидроксильная группа относительно легко атакует карбонильный атом углерода сложного эфира. Карбонильная активность различных соединений хорошо описана в учебнике «Органическая химия» (Ю.С. Шабаров, М., Химия, 1994, часть 1, стр. 372-384).

При атаке аминокислотной группой (из АК2) атома углерода карбонильной группы (из производного АК1) произойдет аммонолиз и образуется амидная (пептидная связь) между АК1-АК2. Чтобы реакция прошла направленно - только между АК1 и АК2 (чтобы получался только дипептид

АК1-АК2), нужно заблокировать аминогруппу АК1. Для этого лучше использовать остаток ацетила, который дает амидную связь; в клетке это сделано с помощью остатка формила (Рис. 3.4).

Реакция аммонолиза с участием производных двух АК приводит к образованию дипептида. Для того, чтобы нарастить пептидную цепь на еще одну аминокислоту нужно вновь активировать карбоксильную группу дипептида и провести аммонолиз третьей аминокислотой АК3, при этом образуется трипептид. Процесс можно продолжать далее с образованием олигопептидов (греч. *oligos* – немногий; олигопептид содержит прим. десяток АК).

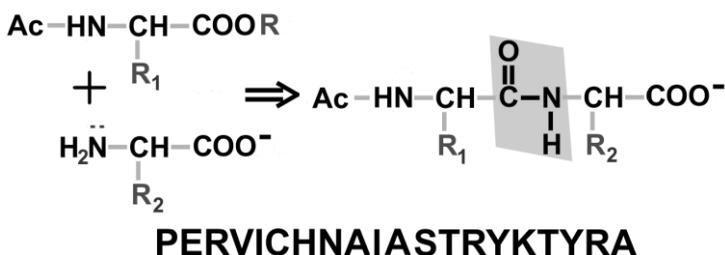


Рисунок 3.4. Реакция образования пептидной связи (вверху).

Последовательность аминокислот - текст, содержащий информацию о будущей структуре белка. Для примера составлены два пептида, однобуквенное представление последовательности которых дает слова "первичная структура" (внизу).

В клетке механизм биосинтеза полипептидов немного сложнее, он будет рассмотрен в главе 7.

В химии макромолекул используют понятие *растущий конец цепи* – это концевая группа, по которой происходит присоединение очередного мономера. При биосинтезе полипептида растущим концом является карбоксильный конец цепи, С-конец. Таким образом, правило записи для химической структуры и первичной структуры полипептида от N-конца (слева) до С-конца (справа) соответствует направлению синтеза полипептида.

Свойства пептидной связи. Как и для любых амидов карбоновых кислот, неподеленная пара электронов атома азота делокализована на карбонильную группу, что придает связи С-N характер частично двойной, точнее - «полуторной». Поэтому вращение вокруг связи С-N затруднено и все четыре атома при пептидной связи - О, С, N и Н, а также соседние α -атомы углерода находятся в одной плоскости. В результате возможна цис- и транс- изомерия (речь о расположении двух α -атомов углерода); природа выбрала транс-изомер. Жесткая пространственная структура пептидной связи налагает определенные стерические ограничения на трехмерную структуру полипептида (конформацию).

Вследствие делокализации неподеленной пары электронов, атом азота не протонируется, следовательно, пептидная связь имеет нейтральный характер, Аналогичными свойствами обладают амиды дикарбоновых кислот - аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q).

Благодаря все той же делокализации неподеленной пары электронов азота, пептидная связь оказывается метастабильной в водных растворах: при нейтральных значениях рН скорость гидролиза настолько низка, что время полупревращения достигает сотен лет.

Пептидная связь имеет уникальную способность к образованию водородных связей. Атом кислорода карбонильной группы является акцептором атома водорода, а соседний атом азота — донором атома водорода. Поэтому

легко себе представить, что если две полипептидные цепи расположить параллельно, то между ними возникнут водородные связи (См. раздел о вторичной структуре белка).

Последовательность АК в белке называется первичной структурой. Первичную структуру не следует путать с химической структурой полипептида: записанная однобуквенными символами от N-конца к С-концу полипептида последовательность АК является текстом, например, PERVICHNAIASTRYKTYRA (Рис. 3.4). Первичная структура относится к информационным понятиям. В нескольких центрах мира созданы и поддерживаются компьютерные базы данных по первичной структуре белка. Для анализа первичной структуры используют, в частности, компьютерный контекстный анализ, для этого первичная структура записывается однобуквенными символами, а не трехбуквенными, как это делали ранее.

Как определяют первичную структуру белка, как читают последовательность АК в белке, как *секвенируют* белок (англ. *sequense* - последовательность)? Алгоритм секвенирования довольно прост – белок (аминокислотный текст) фрагментируют различными способами; получают наборы коротких пептидных фрагментов, структуру которых определить уже легче; после чего восстанавливают порядок их чередования с помощью перекрывающихся последовательностей АК и, тем самым, целиком реконструируют исходную последовательность для всего белка. Для реального экспериментального требуется довольно сложное и дорогое оборудование и, конечно, компьютеры.

Возьмем пептид PERVICHNAIASTRYKTYRA (поскольку в «аминокислотном алфавите» нет U, то используем Y). Допустим, что мы каким-то образом умеем «читать слова» из семи АК. Расщепим исходный пептид после положительно заряженных АК: K, R и H; получим набор из шести коротких пептидов: PER, VICH, NAIATR, YK,

TYR, A. Расщепим исходный пептид после гидроксилсодержащих АК: S и T; получим набор из четырех слов: PERVICHNAIAS, T, RYKT, YRA; одно из которых длинное и не читается. Третий раз расщепим пептид после серосодержащей АК — C; получим два слова: PERVIC и HNAIASTRYKTYRA; одно из которых длинное и не читается. Для окончательного решения задачи необходимо расщепить пептид еще раз, на этот раз - после гидрофобных алифатических аминокислот I и V, в результате получим пептиды PERV, I, CHNAI, ASTRYKTYRA. Из всего набора полученных коротких слов по перекрывающимся фрагментам можно реконструировать исходный пептид.

Алгоритм секвенирования целого белка из 300 АК сведется к чтению многих наборов слов с последующей реконструкцией отдельных предложений, а затем всего текста. Размер среднего белка 300 АК - это 4 строки в тексте книги, из расчета примерно 75 знаков на строку.

Как читают небольшие фрагменты? Для этого применяют метод масс-спектрометрии. Масс-спектрометр разделяет короткие пептиды и их фрагменты в электромагнитном поле согласно отношению масса/заряд частиц (m/z). С помощью компьютерного расчета можно определить, какому аминокислотному составу соответствует полученное значение m/z . Для секвенирования небольших пептидов их расщепляют случайным образом действием лазерного излучения прямо в масс-спектрометре, полученные наборы коротких пептидных фрагментов анализируют во второй камере масс-спектрометра. Для комбинаторного контекстного анализа сложных библиотек пептидов используют компьютерные программы, что позволяет автоматизировать секвенирование.

В этом месте актуально оценить возможное количество вариантов первичных структур белков. Число возможных комбинаций из 20 АК для среднего белка из 300

АК составит 20^{300} — наше воображение не в силах оценить это число. Природа не реализует и малой толики подобного разнообразия: уже упоминалось, что протеом бактериальной клетки - это всего лишь несколько тыс. белков — т.е. меньше, чем 20^3 !

В настоящее время большинство данных по первичным структурам белков получаются путем компьютерного декодирования первичной структуры их генов (ДНК) или их мРНК (см. главу 7).

Первичные структуры сотен тысяч белков собираются и анализируются в специальных компьютерных базах данных (БД). БД предназначены для архивирования, аннотирования и тиражирования первичных структур. Для того, чтобы осмысленно оперировать такими гигантскими объемами экспериментальных данных, необходимо развивать многочисленные компьютерные методы, например, контекстный анализ. Этим занимается *биоинформатика* — наука о методах и программном обеспечении хранения, организации, анализа биологических данных с целью получения новых знаний. Для этого созданы специальные институты, например, Европейский институт биоинформатики (European Bioinformatics Institute, EBI).

Название биоинформатика образовано в традиционном стиле, что и биофизика, и биохимия. Более академично, было бы определять метод познания первым словом, а предмет познания — вторым, тогда биоинформатика должна быть частью математической биологии (наряду с физической биологией, химической биологией и физико-химической биологией).

Один из примеров контекстного анализа первичной структуры белков — поиск идентичных или похожих участков. При контекстном анализе по известной структуре бел-

ка-шаблона ищут белки-аналоги в различных организмах (они называются *ортологами*). При этом искомые последовательности АК будут отличаться от шаблонной в некоторых участках белка. Чем больше отличий в первичной структуре белков, тем труднее искать идентичные участки, что характерно для эволюционно отдаленных таксонов. Результатом сравнительного анализа будет т.н. *выравнивание* аминокислотных последовательностей. Если выравнивать первичные структуры белков-ортологов, то в результате можно получить т.н. *консенсусную* последовательность, которая будет записана в виде последовательности АК, которые наиболее часто встречаются (Табл. 3.1); при каждой АК в консенсусной последовательности будет стоять индекс, который показывает частоту встречаемости этой АК.

Таблица 3.1. Поиск консенсусной последовательности фрагмента А-цепи белка тромбина. Сравнение последовательностей белков из разных организмов выявило "константные" АК (указаны прописными буквами), преимущественно встречающиеся АК (указаны строчными буквами) и переменные АК (прочерк).

№ остатка	Организм			
	1	11	21	31
Крыса	TFG I	GEADCG	LRPLFEK KSL tDK	TEK ELLd SYIDGR
Мышь	TFG I	GEADCG	LRPLFEK KSL kDt	TEK ELLd SYIDGR
Кролик	TFG t	GEADCG	LRPLFEK KSL kDe rEe	ELLE SYIhGR
Бык	TFG a	GEADCG	LRPLFEK Kqv qDq	TEK ELfE SYIeGR
Овца	TFG a	GEADCG	LRPLFEK KkL qDK TEa	ELfE SYIeGR
Свинья	TFG a	GEADCG	LRPLFEK sSL EDK	TEK ELfE SYIeGR
Орангутан	TFG s	GEADCG	LRPLFEK KSL EDK TEr	ELLE SYIDGR
Человек	TFG s	GEADCG	LRPLFEK KSL EDK TEr	ELLE SYIDGR
Макака	TFG I	GEADCG	LRPLFEK KSL EDK TEg	ELLE SYIDGR
Консенсус	TFG -	GEADCG	LRPLFEK KSL eDK	TEk EL le SYIdGR

В первом приближении количество несовпадающих АК можно принять за меру эволюционного различия; используя этот параметр для однотипных клеток из различных организмов можно построить эволюционное древо этих организмов.

Паттерны первичной структуры – это определенные последовательности АК, которые присутствуют в разных белках; как правило, паттерны имеют особые функциональные и/или структурные свойства. Например, существуют паттерны для трансмембранных белков (глава 4) и проч.

Устойчивые сочетания первичных структур, которые присутствуют в разных белках, называются *мотивами первичной структуры*.

Пространственная структура белка. Биоинформатика предоставляет множество БД и программных инструментов для классификации структур белков и выстраивания иерархии вторичных структур, супервторичных структур, доменов и далее; для более детального знакомства читатель отсылается к примеру одной из них — SCOP (*Structural Classification of Proteins* – структурная классификация белков).

Вторичная структура белка

Вторичной структурой белка называют *локальную упорядоченную укладку* полипептидной цепи за счет водородных связей полипептидного остова. Основные типы вторичной структуры белка - это β -структура и α -спираль, которые образуются и поддерживаются за счет водородных связей, образованных атомами пептидной связи без участия боковых радикалов. У пептидной связи атом азота является донором атома водорода, а атом карбонильного кислорода — акцептором; напомним, что энергия водо-

родной связи – от 5 до 30 кДж/моль. Влияние боковых радикалов на образование вторичной структуры невелико.

β-структура. Если полипептидная цепь на каком-то участке укладывается сама на себя (в виде простой шпильки для волос) - это и есть *β-шпилька*, у которой два пептидных тяжа антипараллельны (противонаправлены), длина участка обычно составляет 3-10 АК, полипептидная цепь почти максимально растянута. Поскольку пептидные связи чередуются регулярно, то доноры и акцепторы водородной связи тоже чередуются регулярно, поэтому получается локальная регулярная сетка водородных связей.

Шпилька не плоская - у регулярных пространственно фиксированных пептидных связей α -углеродные атомы находятся в транс-конфигурации; это приводит к регулярным изломам, поэтому иногда такую вторичную структуру называют *β-складкой*. Несколько антипараллельных участков, расположенных бок о бок, образуют *β-слой* или *β-складчатый слой*. Боковые радикалы АК располагаются перпендикулярно к слою.

Возможен еще один тип β -структуры: *параллельная β-структура* (Рис. 3.5) образуется в случае, если второй участок для образования β -структуры не просто укладывается сам на себя, а разворачивается в петле так, что взаимодействует с первым участком в той же ориентации. Схематично β -структуры изображаются стрелками с направлением от N-конца к C-концу.

α-спираль. Вторым примером классической локальной пространственной укладки полипептидной цепи является α -спираль: ее водородные связи также формируются атомами пептидных связей без участия боковых радикалов. Это правозакрученная спираль (как у большинства бытовых устройств: шурупов, винтов, штопора и проч.).

Водородные связи α -спирали образуются между атомом карбонильного кислорода АК_i и атомом водорода

амидной группы AK_{i+4} . Если смотреть с торца спирали, то ее поворот на 1 остаток АК составляет около 100° , т.е. период спирали составляет 3,6 АК/виток. Таким образом, водородные связи направлены примерно параллельно оси спирали (Рис. 3.5). α -спираль встречается в белках несколько чаще, чем β -структура. Боковые радикалы расположены по периферии спирали.

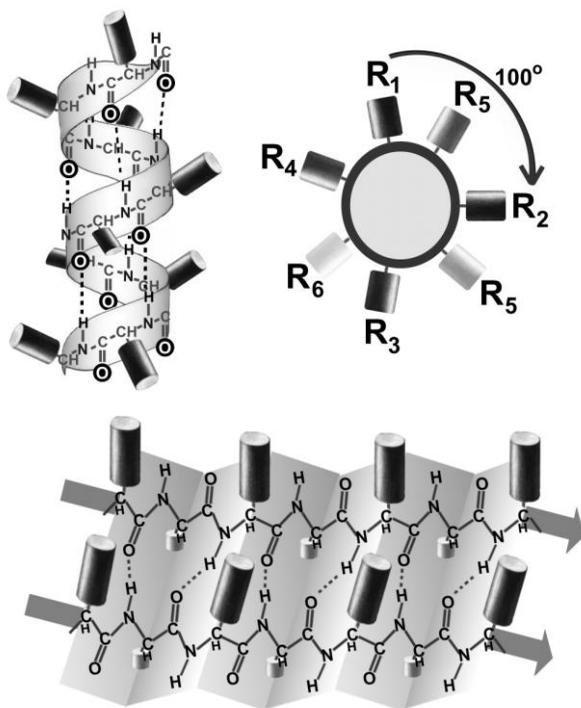


Рисунок 3.5. Вторичная структура белка: α -спираль в двух проекциях (вверху) и параллельная β -структура (внизу). Водородные связи обозначены пунктиром, а боковые радикалы АК - цилиндрами. Стрелки в β -структуре указывают направление хода цепи.

Супервторичная структура

Супервторичная структура - это минимальный модуль структуры белка, который состоит из нескольких элементов вторичной структуры. Устойчивые сочетания вторичных структур, которые присутствуют в разных белках, называются *структурными мотивами* или укладками (сравни с мотивом первичной структуры). Интересно отметить, что природа использует эти однотипные «кирпичики» для построения белков, которые имеют разные функции; конкретный структурный мотив может быть в структуре и фермента и структурного белка.

Структурные мотивы с β -структурами.

Для β -структур можно привести несколько примеров структурных мотивов. *β -меандр* (ортогональный орнамент) образован двумя или более последовательными антипараллельными тяжами, соединенных петлями. Это типично для β -слоев, β -бочек (Рис. 3.6), β -пропеллеров и проч.

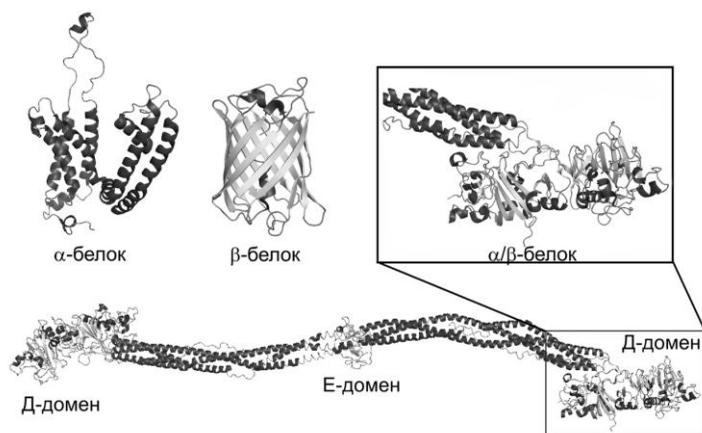


Рисунок 3.6. Вверху: примеры белков с различными элементами супервторичной структуры. Внизу: пример белка, состоящего из нескольких доменов; в каждом из доменов можно найти элементы супервторичной структуры.

Греческий ключ образован β -тяжами, которые сложены в форме бутерброда – три антипараллельных тяжа, а четвертый тяж соседствует с первым благодаря образованию длинной петли (Рис. 3.7). Подобная структура характерна для иммуноглобулинов/антител.

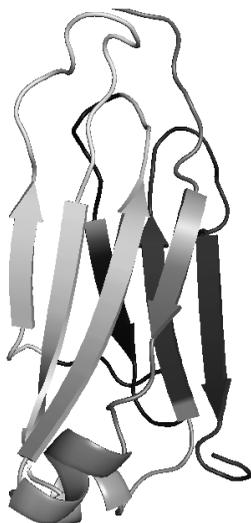


Рисунок 3.7. Супервторичная структура белка иммуноглобулина (приведен фрагмент структуры): β -сэндвич с антипараллельной укладкой цепи. Верхний β -лист окрашен светло-серым цветом, а нижний - темно-серым.

Структурные мотивы с α -спиралями. Один из самых простых и очень важных структурных мотивов называется *α -поворот-а*. Структурный мотив образован двумя α -спиралями, расположенными под углом друг к другу, их соединяет короткая петля с фиксированной структурой (Рис. 3.6). Пример еще одного структурного мотива – пучок из нескольких α -спиралей, расположенных бок о бок,

будет рассмотрен в разделе трансмембранных белков в следующей главе (глава 4).

Структурные мотивы, содержащие β -структуры и α -спирали. Если петля между двумя параллельными β -тяжами достаточно длинная, то она часто образует α -спираль, которая лежит вдоль β -тяжей. Все три элемента взаимодействуют друг с другом и образуют единый структурный мотив, который называется β - α - β .

Домен

Супервторичная структура может быть составной частью более сложных структур. *Доменом* называется структурно выраженный и локально обособленный участок структуры. Домен может быть обособлен структурно и функционально. В простейшем случае понятия супервторичной структуры и домена совпадают.

Яркий пример такого совпадения домена с супервторичной β -структурой — иммуноглобулиновый сандвич. Он имеет структуру типа греческий ключ и образован двумя β -слоями: три β -тяжа и четыре β -тяжа наложены друг на друга в виде бутерброда (Рис. 3.7).

Яркими примерами совпадения доменов с супервторичной α -структурой являются трансмембранные домены трансмембранных белков, например, аквапорина, калиевого канала, родопсина и проч., которые будут обсуждаться в следующей главе (глава 4). Они образованы пучком α -спиралей, уложенных бок о бок, что формирует своего рода стенки канала.

Третичная структура

Третичная структура белка – это расположение всех атомов белковой макромолекулы в пространстве. Термин *третичная структура* эквивалентен термину *конформация*. Конформация белка – это результат большого числа

слабых взаимодействий, которые находятся в равновесном балансе. Важную роль в сворачивании белка в уникальную третичную структуру играют нековалентные взаимодействия между боковыми радикалами аминокислот. Природа взаимодействий будет определяться природой бокового радикала; она очевидно следует из классификации аминокислот (Рис. 3.3) и природы нековалентных взаимодействий (Табл. 1.1).

В некоторых случаях, если в третичной структуре белка оказываются рядом два остатка цистеина (-SH), то при окислении кислородом воздуха между ними может образоваться ковалентная дисульфидная связь S-S. Такая связь очень сильно стабилизирует третичную структуру белка по отношению к денатурирующим воздействиям, например, нагреванию.

Любое изменение условий – как внешних (например, pH, солевой состав), так и внутренних (замены АК, модификации АК) приводит к изменению баланса слабых взаимодействий, что, в свою очередь, приводит к изменению конформации белка – происходит *конформационный переход*.

Сложная поверхность белка формирует сложный рельеф и обеспечивает уникальное распределение зарядов и функциональных групп на поверхности. Это определяет, в конце концов, уникальное расположение будущих контактов для специфического взаимодействия с другими молекулами (т. н. *молекулярного узнавания*). Правильное молекулярное узнавание критично как для ферментативного катализа, так и для самосборки надмолекулярных супрамолекулярных структур, которые обеспечивают разнообразные функции клетки.

На баланс слабых взаимодействий при формировании структуры и функции белка влияют точечные мутации, т.е. замены всего одной АК из нескольких сотен. Наиболее яркий пример – это единичная мутация в гемоглобине: замена отрицательно заряженной АК на гидрофобную (E6V) вызывает агрегацию белка и дефицит кислорода. Поскольку содержание гемоглобина в эритроцитах очень высоко (35% по весу, 96% сухого веса), то агрегация мутантного гемоглобина приводит к деформации формы клетки - из овальной она переходит в серповидную; кроме того, клетка теряет эластичность. Мутантные эритроциты быстро выбраковываются и разрушаются: время жизни мутантов составляет 10-20 дней против 90-120 дней в норме.

Все данные о пространственной структуре белка, полученные рентгеноструктурным анализом (РСА) и ядерным магнитным резонансом (ЯМР), собираются в БД (сравни с БД первичной структуры). БД пространственных структур предназначены для архивирования, аннотирования и тиражирования координат атомов белков. Наиболее авторитетными БД для пространственных структур биологических макромолекул считаются PDB (Protein Data Bank) и EBI (European Bioinformatics Institute). БД содержат данные о структуре белка, учебный и вспомогательный материалы, включая обзор новостей, инструменты для новых записей, а также специализированные средства поиска и просмотра структур. Все третичные структуры различных белков можно классифицировать согласно, например, БД SCOP (Structural Classification of Proteins, Структурная классификация белков) и ряде других. Некоторые примеры построения архитектуры белков из блоков мы уже рассматривали. Поиск рациональных причин – почему в каждом конкретном случае природа использует именно этот структурный мотив (или домен) для выполнения конкретной функции – очень интересная современная задача. Оче-

видно, что использование уже готовых строительных (функциональных) блоков для построения новых белков – это очень существенный момент в эволюции. Представить себе, что в эволюции новые белки создавались путем перебора бесконечных комбинаций точечных замен/мутаций отдельных АК, с точки зрения вероятности практически невозможно.

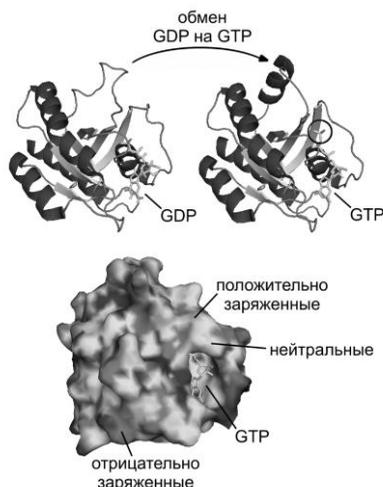


Рисунок 3.8. Конформационный переход белка при связывании разных лигандов - GDP или GTP (вверху). Два способа представления пространственной структуры белка: в виде набора элементов вторичной структуры (вверху) и в ван-дер-ваальсова модель молекулы (внизу). В ван-дер-ваальсовой модели нейтральные остатки аминокислот окрашены светло-серым, положительно заряженные - серым, а отрицательно заряженные - темно-серым; т.о. модель дает наглядное распределение функциональных групп на поверхности. Лиганд (GTP) детализирован - приведена стрелневая модель, детализирующая все атомы и длины связей между ними.

Структуры белков в пространстве можно изображать разными способами. Можно представить детальную структуру белка со всеми атомами, например, чтобы увидеть положение функциональных групп отдельных участков, например, активного центра ферментов. В этом случае можно увидеть, какие группы будут взаимодействовать с субстратом, а какие - участвовать в реакции и проч. Для иллюстрации архитектуры белка полезно использовать стилистические изображения элементов вторичной структуры, например, в виде лент. Для иллюстрации свойств поверхности белка или построения объемных моделей полезно изображать белок с помощью моделей, которые учитывают ван-дер-ваальсовы радиусы атомов (Рис. 3.8).

Поверхность белка имеет не только уникальный рельеф, но и достаточно разнообразна по распределению поверхностных зарядов, от которых зависит суммарный заряд белка. Он характеризуется т.н. *изоэлектрической точкой* (pI), которая показывает, при каком рН все заряды макромолекулы будут скомпенсированы и общий заряд белка будет равен нулю.

Белковая глобула. Укладка в третичную структуру всех элементов вторичной структуры и структур более высокого ранга во многом определяется общим принципом формирования белковой глобулы. Важную роль играет гидрофобный эффект – гидрофобные боковые радикалы «прячутся от воды» и формируют ядро глобулы, а на поверхности глобулы остаются гидрофильные боковые радикалы, которые контактируют с водой.

Четвертичная структура

Четвертичная структура белков. Этим термином называют стабильные супрамолекулярные комплексы белка с другими макромолекулами – белками, нуклеиновыми кислотами и проч. Так, например, многие ферменты состоят

из нескольких полипептидных цепей, т.е. имеют мульти-субъединичное строение. К типичным супрамолекулярным комплексам относятся вирусы, которые часто свою оболочку формируют из белковых молекул: однотипная укладка белковых субъединиц приводит к замечательным по форме и элегантности структурам, например, икосаэдрическим, цилиндрическим и проч.

Кроме стабильных комплексов белки образуют *транзитные комплексы*, т.е. комплексы, которые образуются временно для выполнения какой-либо функции, а затем диссоциируют на исходные компоненты. Один белок может иметь различных партнеров в зависимости от конкретной функции, которую он в данный момент выполняет. Эти многочисленные взаимодействия описывает *интерактом* – совокупность данных о взаимодействиях белка (или группы белков); часто интерактом для наглядности представляют в виде сложных графов.

Динамика формирования пространственной структуры

Мы выстроили простую и понятную иерархию в организации пространственной структуры белков. Локальная вторичная структура формируется за счет водородных связей основной цепи полипептида. Формирование супервторичной структуры может образовать либо структурный мотив, либо более сложный автономный домен. На завершающих этапах «сворачивания» белка в конкретную пространственную структуру важную роль играет природа боковых радикалов АК. Именно этот смысл вкладывается в утверждение, что «первичная структура белка определяет его пространственную структуру».

Рассмотрим процесс формирования пространственной структуры в динамике, или, говоря другими словами, ренатурацию, сворачивание белка. Две крайних структуры белка

– это полностью развернутое, *денатурированное* (D) состояние и исходная, *нативная* (N) конформации. Конформация N описывается уже рассмотренной структурной иерархией. Состояние D теоретически соответствует случайному набору конформаций *статистического клубка* со случайным распределением АК в пространстве. Для модельной свободно-сочлененной цепи идеальное поведение определяется собственным тепловым движением и движением молекул растворителя. Можно рассчитать объем такого случайного клубка, например, по формуле Эйнштейна.

Как происходит ренатурация белка? Этот вопрос имеет не только сугубо теоретическое значение, он очень важен для биотехнологии, поскольку практически значимые белки (например, для медицины) выделяют из клеток-продуцентов в денатурированном состоянии; после их очистки, на последнем этапе необходима ренатурация в активное нативное состояние.

Проблема спонтанной самоорганизации белка сформулирована в «парадоксе Левинтала». У полипептида существует колоссальное число возможных конформаций: если каждый остаток имеет, например, 10 возможных конформаций, тогда для полипептида из 100 АК будет возможно 10^{100} конформаций. Если переход из одной конформации в другую занимает около 10^{-13} сек, то перебор всех возможных конформаций должен занять около 10^{80} лет, эта величина находится за пределами нашего восприятия. Каким же образом конформация белка может переходить в свою нативную структуру за минуты? Дело в том, что нативная структура белка определяется не стабильностью (не термодинамикой) состояния, а *кинетикой*, т.е. скоростью перехода из одного состояния в другое. Причина парадокса такова. При сворачивании происходит сближение/упорядочивание АК в пространстве; сближенные элементы взаимодействуют и стабилизируют структуру.

Если эти два процесса сильно разнесены во времени, то мы получаем эффект Левинтала. Если при локальном сближении участков полипептида стабилизация происходит сразу и такие локальные структуры (например, α -спирали) немедленно становятся центрами самоорганизации цепи, то доминирует кинетический фактор и белок ренатурирует быстро.

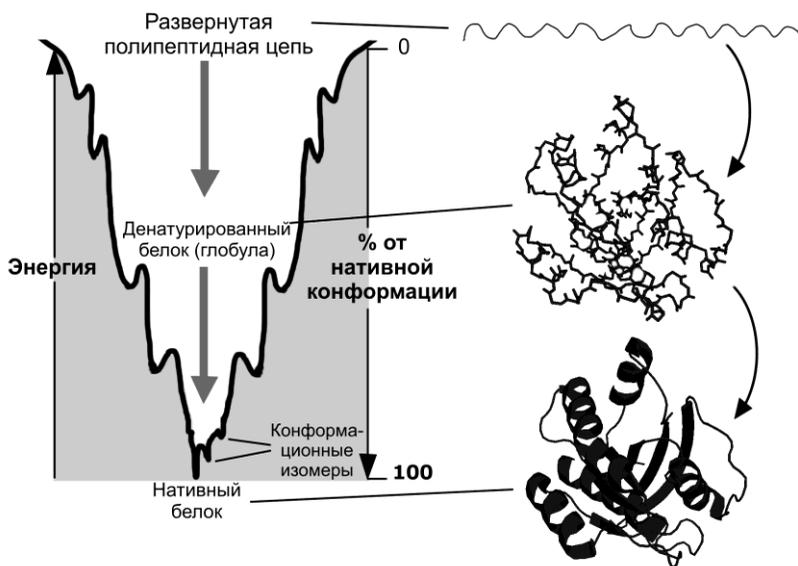


Рисунок 3.9. Энергетический ландшафт возможных конформаций белка (слева) и модели развернутой цепи, денатурированной и нативной конформаций белка (справа).

И действительно, небольшие растворимые в воде глобулярные однодоменные белки из 50 - 100 АК сворачиваются быстро – за мсек, сек или десятки сек. Так как время фиксации одного звена мало (1-10 нс для α -спиралей), то белок должен сворачиваться мгновенно (100 АК за 100 - 1000 нс); существование энергетических барьеров между

локальными структурами замедляет процесс сворачивания. Это процесс хорошо иллюстрирует т.н. *энергетический ландшафт* (иногда называемый энергетической воронкой) (Рис. 3.9).

В клетках существуют специальные белки - *шапероны*, которые обеспечивают многие функции: правильное сворачивание других белков, восстановление структуры белков после их частичной денатурации, а также создание белковых комплексов.

Шапероны фиксируют промежуточные конформации целевых белков, снижая тем самым вероятность получения быстро и неправильно свернутых структур. Концентрация некоторых шаперонов в клетке возрастает при резком повышении температуры окружающей среды, поэтому они называются *белками теплового шока* (Hsp, англ. *heat shock proteins*).

Глава 4

Клетка как открытая система. Мембранные белки.

Для гомеостаза, стабильного существования открытой сложной системы живого, необходимо не только сформировать границы, которые отделяют эту систему от внешней среды, но и обеспечить обмен веществом и преобразование энергии. В клетке такую функцию выполняет биологическая мембрана.

Биологическая мембрана

Биологическая мембрана – это сложный супрамолекулярный комплекс, организованный, в основном, из *липидного бислоя и мембранных белков*.

Биологические мембраны окружают все живые клетки, а также внутриклеточные компартменты (ядра, митохондрии, хлоропласты и проч.). Основная функция биологических мембран – это образование *динамических границ раздела*; например, между клеткой и окружающей средой, между внутриклеточным компартментом и цитоплазмой. А благодаря встроенным в липидный бислой мембранным белкам биологические мембраны не просто разделяют компартменты, но и активно участвуют во многих клеточных процессах.

Белки по-разному встроены в липидный бислой. Некоторые белки сорбированы на поверхности липидного бислоя; другие белки пронизывают липидный бислой насквозь. Именно мембранные белки определяют характерное функциональное «лицо» каждой конкретной клетки (Рис. 4.1).

Структура и функция мембранных белков очень разнообразна. 1. Наружные белки, которые расположены на поверхности клетки; они могут взаимодействовать с мем-

бранными белками других клеток, обеспечивая межклеточные контакты.

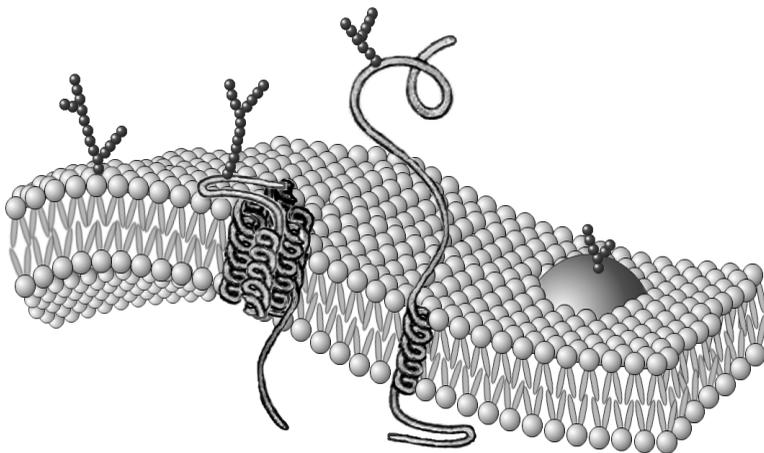


Рисунок 4.1. Биологическая мембрана: липидный бислой и встроенные в него мембранные белки.

2. Сенсоры - рецепторы для внеклеточных лигандов, которые встроены в мембрану; с их помощью клетки акцептируют («принимают») различные молекулярные сигналы от других клеток или из среды. Такие сигнальные молекулы могут быть низкомолекулярными или макромолекулярными. В одном из вариантов при связывании молекулы вне клетки происходит фосфорилирование белков внутри клетки. 3. С помощью специальных мембранных доменов в липидный бислой встроены ферменты. Имея активный центр вне мембраны ферменты катализируют химические реакции; в зависимости от ориентации активного центра достигается локализация реакций. 4. Перенос веществ между внешней средой и клеткой осуществляют трансмембранные белки-каналы, образующие «колодцы» (каналы). Для сохранения осмотического равновесия для клетки особенно важен свободный обмен водой. Если че-

рез мембрану переносятся заряженные ионы против градиента концентрации, то по разные стороны мембраны возникает разница в их концентрации, которая определяет трансмембранный потенциал. 5. Трансмембранные мультисубъединичные белковые комплексы могут обеспечивать не один, а несколько процессов, которые связаны друг с другом (сопряжены) – так, например, происходит синтез АТФ, сопряженный с транспортом протонов. Более подробно эти процессы будут разобраны в соответствующих разделах.

Несмотря на разнообразие липидов, используемых для построения липидного бислоя, его организация достаточно проста и однородна (одинакова). Напротив, качество (функция) и количество встроенных в бислой белков сильно зависит от типа и функции конкретной клетки. В связи с этим соотношение липидов и белков в биологических мембранах различных клеток сильно отличается; в некоторых случаях весовой процент белков намного превышает процент липидов (Табл. 4.1).

Таблица 4.1. Состав биологических мембран разных организмов.

Организм	Липиды		Белки
	Фосфо- липиды	Стерины (включая хо- лестерин)	
Человек (миелиновая оболочка нервных волокон)	30	19	30
Кукуруза (лист)	26	7	47
Дрожжи	7	4	52
Бактерии (<i>E. coli</i>)	25	-	75

Подобная диспропорция в сторону белков особенно показательна для клеток бактерий. Можно предположить, что поскольку каждая клетка бактерий должна выживать индивидуально, сама по себе, мембрана каждой клетки должна обладать большим количеством белков с самыми разнообразными функциями: сенсорными, транспортными, проч., что позволяет ей приспосабливаться к разнообразным и изменчивым окружающим условиям. Клетки многоклеточного организма находятся в более стабильных условиях и выполняют специализированные функции, поэтому их мембрана содержит меньше белков.

Несмотря на сложное строение, биологическая мембрана образуется путем *самоорганизации* – т.е. супрамолекулярный комплекс собираются спонтанно из составляющих компонентов. Самоорганизация или самосборка – это очень важный процесс, природу и движущие силы которого необходимо изучать не только для развития фундаментальной науки, но и для прикладной бионанотехнологии. Развитие нанотехнологической составляющей определит возможность целенаправленной сборки супрамолекулярных наноконструкций с заданными свойствами и функцией.

Спонтанность самоорганизации биологической мембраны определяется особыми гидрофобными свойствами мембранных белков; точнее их гидрофобных доменов, которые встраиваются в гидрофобный липидный бислой. Такие гидрофобные домены мембранных белков формируются гидрофобными АК, боковые радикалы которых хорошо «растворяются» в гидрофобной среде, образованной жирными «хвостами» фосфолипидов бислоя. И действительно, в первичной структуре мембранных белков гидрофобные АК расположены блоками, кластерами. Во многих случаях такие блоки имеют α -спиральную вторичную структуру. Поскольку у α -спирали боковые радикалы АК расположе-

ны на периферии (Рис. 3.5), это позволяет спирали спонтанно и эффективно встраиваться в липидный бислои (Рис. 4.1).

Поскольку самоорганизация биологической мембраны и поддержание ее структуры происходит за счет нековалентных взаимодействий, она имеет очень динамичную «текущую» псевдо-жидкую структуру, которая позволяет всем компонентам перемещаться в двух измерениях. Этот феномен называется *латеральной диффузией*.

Транспорт молекул через биологическую мембрану

Система называется открытой, если она обменивается с внешней средой веществом и трансформирует энергию. В сложной системе живого для клетки такой обмен обеспечивают мембранные белки биологической мембраны.

Мысленно рассмотрим перенос молекул через липидный бислой как таковой. Самый простой процесс перемещения молекул в пространстве — это диффузия. Допустим, что мы имеем два компартмента, разделенных мембраной, через поры которой может проходить вещество. Допустим, что в данный момент времени в первом компартменте концентрация вещества выше, чем во втором. Тогда вещество будет диффундировать через поры мембраны из первого компартмента во второй до тех пор, пока концентрации вещества не уравниваются.

В химической биологии *простая диффузия* молекул через липидный бислой называется *пассивным транспортом*. Пассивный транспорт вещества зависит от проницаемости бислоя и от химической природы вещества - прежде всего, от размеров и заряда. Легче всего проникают через мембрану газы. Для остальных молекул этот процесс зависит от коэффициента распределения между водой и фосфолипидным бислоем, который определяется растворимостью. Органические молекулы гидрофобны и могут

перейти из раствора в бислой («раствориться в хвостах фосфолипидов»), там и остаться; аналогичный процесс происходит в делительной воронке при экстракции гидрофобного вещества из водной фазы в органический растворитель, который не смешивается с водой. Полярные/заряженные молекулы, например, вода, взаимодействуют с полярными группами фосфолипидов на поверхности бислоя, дальнейший спонтанный переход в гидрофобную часть липидного бислоя практически исключен.

Описание *энергетики* трансмембранного переноса молекулы можно разбить на три этапа. Растворенная в воде молекула гидратирована, поэтому сначала она дегидратируется, на что нужно потратить энергию. Затем дегидратированная молекула переносится в гидрофобный липидный бислой, на что тратится очень много энергии, в зависимости от химической природы молекулы (в частности, ее полярности). На третьем этапе молекула переносится из гидрофобного липидного бислоя в водную среду, где молекула вновь гидратируется с выделением энергии гидратации, равной энергии дегидратации.

Таким образом, общий энергетический баланс переноса определяется энергетическим барьером переноса молекулы из воды в фосфолипидный бислой. Для того, чтобы этот энергетический барьер каким-то образом снизить можно создать в фосфолипидном бислое сквозные «молекулярные каналы» с меньшей гидрофобностью (лат. *canalis* — труба, жёлоб). Более радикальное решение – создать каналы, внутренние «стенки» которых хорошо взаимодействуют с переносимым веществом. Подобные молекулярные каналы образуются с помощью специальных трансмембранных белков. Процесс переноса будет не только более эффективным, но и специфичным, если переносимое вещество будет образовывать специфические комплексы с группами внутри канала. В этом случае, с

точки зрения химии, процесс перехода вещества из воды в мембранный канал будет аналогичен процессу экстракции вещества из воды в органическую фазу с комплексоном.

Таким образом, процесс пассивного переноса вещества X через биологическую мембрану может происходить следующим образом. Переносимое вещество X из раствора с одной стороны мембраны переходит в комплекс, образованный с функциональными группами внутри «колодца» трансмембранного белка; реакция комплексообразования обратима. Диссоциация комплекса приводит к появлению вещества X с другой стороны мембраны, процесс приобретает направленность благодаря существующей разнице концентраций вещества X.

Трансмембранные белки, образующие каналы

Каждый каналобразующий трансмембранный белок имеет три домена: внеклеточный (наружный), трансмембранный (встроенный в липидный бислой) и внутриклеточный (цитоплазматический). Как уже отмечалось, α -спиральная структура белка должна особой, чтобы обеспечить построение «колодца» в липидном бислое. Для этого, наружные стенки канала должны иметь гидрофобные АК, чтобы трансмембранный домен белка встроился («растворился») в гидрофобную среду жирных «хвостов» фосфолипидов бислоя. И действительно, в первичной структуре известных трансмембранных белков гидрофобные остатки собраны в кластеры, блоки. Во многих случаях эти блоки формируют не просто отдельные α -спирали, а целый пучок из 5-7 α -спиралей, уложенных бок о бок; именно такая супервторичная структура молекулярной конструкции белка-канала обеспечивает его уникальные свойства (Рис. 4.2).

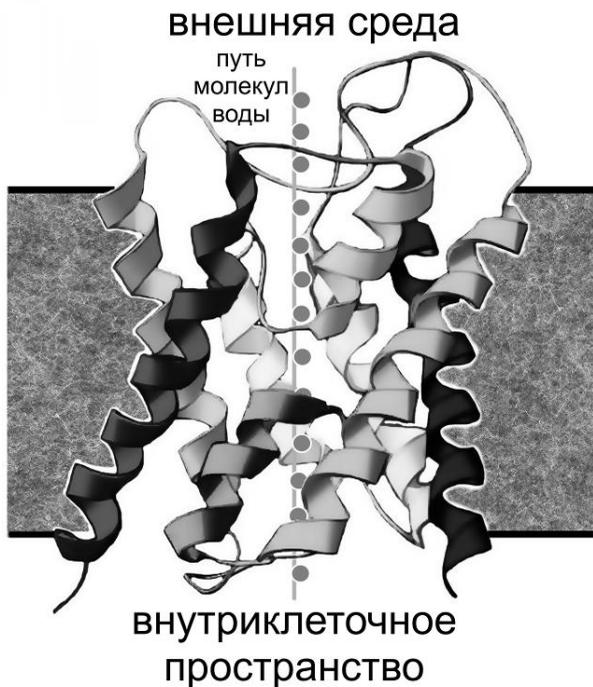


Рисунок 4.2. Пространственная структура мембранного белка-канала: пучок α -спиралей пронизывает липидный бислой, внутри белка есть пора, селективно пропускающая определенное вещество (в данном белке, аквапорине, вещество - вода).

Подобная структура α -спирального канала диктует особые требования к природе и расположению боковых радикалов АК для отдельных α -спиралей. Они должны иметь боковые поверхности трех типов. Те части поверхности α -спиралей, которые обращены на периферию канала, должны иметь кластеры гидрофобных боковых радикалов АК, которые «растворяются» в остатках жирных кислот фосфолипидов бислоя. Второй тип природы боковых

радикалов должен обеспечить белок-белковые взаимодействия между α -спиралями в пучке. И, наконец, те части поверхности α -спиралей, которые выходят во внутреннюю полость канала, должны иметь АК, боковые радикалы которых будут координировать транспортируемую молекулу; т. е. заполнять ее координационную сферу и компенсировать потерю гидратной оболочки при переходе из воды в полость канала. Конкретная природа боковых радикалов внутренней полости будет определяться химической природой перемещаемой молекулы.

Примеры транспорта молекул через биологические мембраны

Транспорт молекул через биологические мембраны может быть двух типов: пассивный транспорт и активный транспорт. Пассивный транспорт молекул – это диффузия молекул по градиенту концентрации; трансмембранные белки облегчают диффузию, формируя промежуточные комплексы с перемещаемыми молекулами. Напротив, активный транспорт осуществляется против градиента концентрации и поэтому требует затрат энергии. Для его осуществления необходима «движущая сила», например, конформационные изменения белка или его *кофактор*.

Кофактор белка — органическая молекула небелковой природы или неорганический ион (чаще - катион металла), которые необходимы для функциональной активности данного белка. Другими словами — это молекула-помощник. Кофактор, который прочно связан с белком, или ковалентно связан с белком, называется простетической группой. Эта группа, которая присутствует в белке постоянно. Органические молекулы-кофакторы часто являются витаминами или их метаболитами.

Пассивный транспорт

Водные каналы

Самая парадоксальная и захватывающая ситуация с транспортом молекул через липидный бислой наблюдается для воды: живой клетке нужен быстрый обмен молекулами воды между цитоплазмой и окружающей средой, чтобы избежать осмотических осложнений. Таким образом, с одной стороны, липидный бислой используется для того, чтобы отделиться от окружающей среды, в том числе и от воды; а с другой стороны, созданный барьер должен хорошо и быстро пропускать через себя воду, и только воду. Другими словами – в липидном бислое необходимо иметь большое количество селективных водных каналов. Действительно, в эксперименте было показано, что скорость диффузии воды через биологическую мембрану клетки очень высока - она близка к скорости свободной диффузии молекул воды в воде!

Высокоскоростную диффузию воды через липидный бислой, 10^9 молекул в сек, обеспечивают трансмембранные белки – *аквапорины*, название которых самоочевидно (аква + пора). Открыватель аквапорина, нобелевский лауреат П. Эгр, назвал аквапорины водопроводной системой клетки. Мембрана каждой клетки пронизана молекулами аквапоринов – их плотность достигает нескольких тысяч на квадратный микрометр поверхности. Нарушение свободной диффузии воды через клеточную мембрану приводит к осмотическим нарушениям в клетках и тканях, что вызывает патологии; напомним, что человеческое тело весом 75 кг содержит 50 кг воды. Хорошо известно, что после приема очень соленой пищи всегда мучает жажда – это вызвано необходимостью восстановления осмотического баланса потребляемой водой путем снижения концентрации соли.

Каким образом аквапорин обеспечивает такой быстрый обмен воды через липидный бислой? В главе 2 мы

упоминали, что в водной среде каждая молекула воды с помощью водородных связей взаимодействует с четырьмя другими молекулами и образует молекулярные кластеры. Разумно предположить, что для того, чтобы молекула воды свободно диффундировала из воды во внутренний канал аквапорина необходимо исходные водородные связи обменять на новые водородные связи в полости канала. В идеальном варианте при условии эквивалентности всех связей такой процесс не требует энергии. (Вспомните общее правило транспорта: перемещаемая молекула должна давать комплекс внутри канала).

Как же на самом деле работает аквапорин? Для селективного транспорта молекул воды (и только воды) необходимо прежде всего исключить транспорт протонов - катионов, которые всегда присутствуют в воде. Поскольку размер протонов меньше размеров молекул воды, простое молекулярное сито не может обеспечить селективности.

Каждая молекула аквапорина – это пучок из шести α -спиралей, которые образуют структуру типа “песочные часы” (Рис. 4.3); роль песчинок выполняют молекулы воды. В мембране аквапорина собраны в тетрамер, объединяя сразу четыре канала.

Аквапорин обеспечивает три ключевых фактора селективности: входной электростатический барьер для протонов, низкая растворимость протонов внутри самого канала, и, как ключевое условие, - образование внутри канала комплекса с водой.

Во входной воронке канала, чуть выше самой узкой его части, расположен т.н. «селективный барьер» с мотивом ar/R (англ. ar - *aromatic*, ароматическая АК/аргинин) – четыре АК образуют кластер из двух мотивов. У кластера две функции – гуанидиновая группа бокового радикала R связывает молекулу перемещаемой воды водородной связью и одновременно отталкивает протон (и любой другой

катион); поэтому, несмотря на меньшие размеры, протон не попадает в канал.

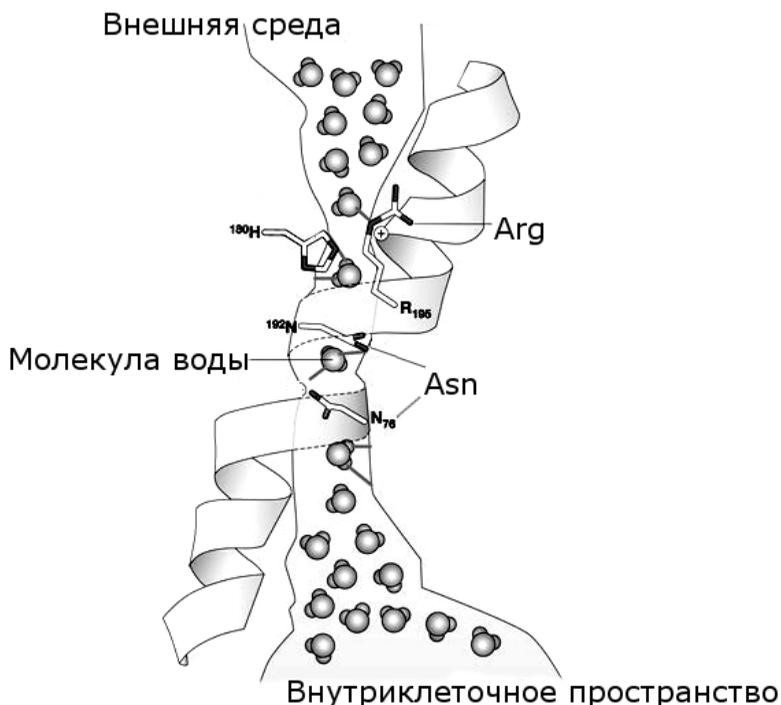


Рисунок 4.3. Схема переноса молекул воды аквапорином. Для наглядности приведена только одна из α -спиралей белка, структура белка приведена на Рис. 4.1. Молекулы воды изображены серыми шариками, ключевые аминокислоты подписаны.

Внутри самого канала диэлектрическая проницаемость мала - несколько единиц, что в десятки раз меньше, чем для воды (около 80). Даже если протоны проскакивают через положительно заряженный селективный барьер внутрь канала, они не могут двигаться дальше в такую неполяр-

ную среду; это еще больше снижает вероятность появления протона внутри канала аквапорина.

По мере продвижения к центру диаметр канала сужается, большие молекулы не могут пройти через канал; а размеры самой узкой его части соответствуют размерам молекулы воды, поэтому туда попадает только одна молекула воды. С этой молекулой происходят благоприятные, с точки зрения энергии, события: ее акцепторный кислород образует водородные связи с двумя амидами боковых радикалов аспарагинов из мотива NPA. Таким образом, молекула воды просто меняет партнеров по водородным связям: вместо соседних молекул воды ими становятся боковые радикалы АК канала. А когда молекула воды уходит из канала, то она восстанавливает исходную сетку водородных связей с другими молекулами воды. Таким образом, при диффузии воды через аквапорин, встроенный в липидный бислой биологической мембраны, дважды происходит перераспределение водородных связей. Скорость переноса определяется суммарной разницей в энергии всех промежуточных комплексов: при минимальной разнице диффузия молекулы воды через канал аквапорина будет близка к свободной диффузии.

Ионные каналы

Транспорт ионов через биологические мембраны играет чрезвычайно важную роль в жизни клетки и всего организма, поскольку он прямо связан с электрическими свойствами мембраны и с процессами превращения энергии в клетке. Кроме того, регулируемый/ переключаемый транспорт ионов очень активно используется нейронами для приема, переработки и передачи сигналов, а следовательно, определяет эффективную и правильную работу мозга.

Заряженные ионы не могут диффундировать через гидрофобный липидный бислой; диффузия еще более затруднена, чем в случае воды, поскольку значения заряда иона всегда больше, чем частичного заряда диполя полярной молекулы воды. Прямой перенос через бислой иона практически невозможен, поскольку он не растворяется в гидрофобной среде. Тем не менее, реальные скорости трансмембранного переноса ионов достигают 10^8 молекул в сек, что в 10^4 быстрее, чем скорость переноса веществ, осуществляемого самым быстрым белком-транспортером. При пассивном транспорте ионы K^+ , Na^+ , Ca^+ или Cl^- диффундируют через внутренний канал специальных трансмембранных белков по градиенту концентрации. Поскольку при диффузии происходит изменение концентрации ионов по обе стороны мембраны, такой градиент иногда называют электрохимическим градиентом.

Известно более сотни ионных каналов различного типа. Ионные каналы как трансмембранные белки устроены аналогично водному каналу, который был рассмотрен в предыдущем разделе. То есть, пучок из α -спиралей формирует канал, наружная поверхность которого состоит из АК с гидрофобными боковыми радикалами, а внутренняя поверхность – с гидрофильными. В центре канала в специальной пространственной ориентации расположены функциональные группы, которые отвечают за специфическое комплексообразование с перемещаемым веществом, что и определяет селективность канала.

Мембранные белки подвержены латеральной диффузии, т.е. способны к двумерному перемещению по липидному бислою, они могут обратимо взаимодействовать друг с другом с образованием мультисубъединичных комплексов. Конформация белков в каналах может изменяться при внешних воздействиях: механических, электрических, нековалентных взаимодействиях с лигандами, ковалентных

модификациях. Конформационные изменения белков могут обусловить переходы между двумя дискретными состояниями канала: когда он открыт или, когда он закрыт (Рис. 4.4). Возможность открывать и закрывать ионные каналы эффективно используется клеткой для управления процессами переноса ионов; самые известные примеры – функционирование клеток мышц и нейронов мозга.

Калиевый канал, по другому его можно назвать «каналом утечки катиона калия». В данном примере канал участвует в процессе пассивного транспорта по градиенту концентрации, т.е. катионы калия «утекают» в тот компартмент, где их меньше.

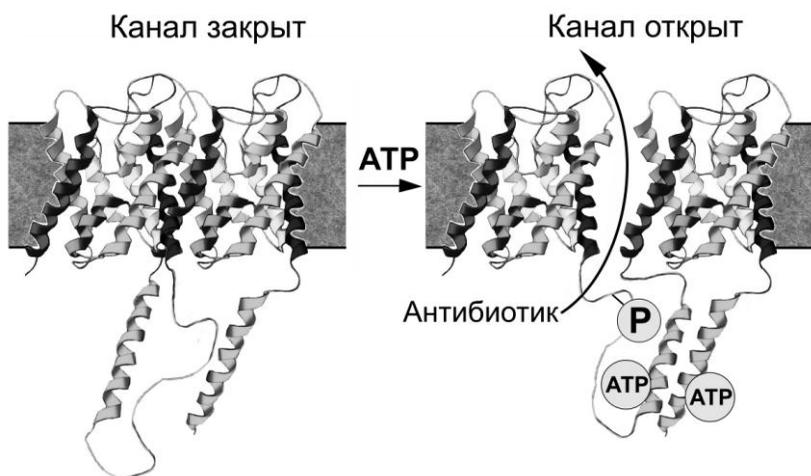


Рисунок 4.4. Пример мембранного белка-канала, работа которого регулируется за счет фосфорилирования и связывания молекул АТФ, что приводит к изменению конформации белка и открытию канала. Данный белок обеспечивает клетке устойчивость к антибиотику за счет его удаления из клетки.

Калиевый канал образован симметричным тетрамером белков. Как и для аквапорина, на внешней стороне мембраны калиевый канал формирует довольно широкую воронку, а трансмембранный домен

образован пучком α -спиралей. Катион калия проходит через входную воронку и попадает в селективный фильтр, размеры которого около 1 нм. При этом катион калия меняет свою гидратную оболочку на координирующие лиганды - кислороды карбонильных групп пептидных связей в специальных петлях белка (Рис. 4.5). Конформация этих петель уникальна и формируется мотивом из пяти АК — TVGYG.

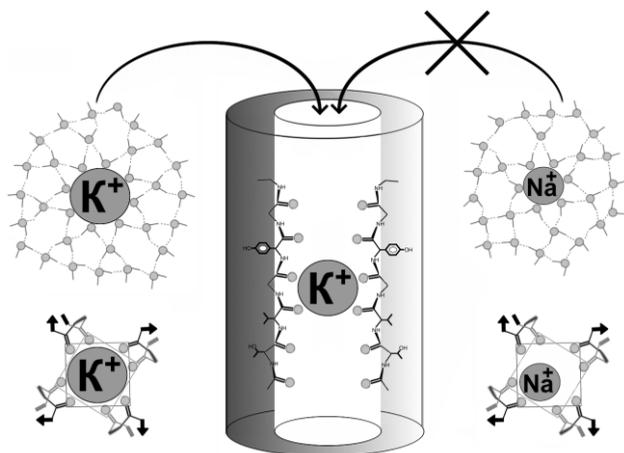


Рисунок 4.5. Схематическое представление работы калиевого канала: катион проникает внутрь белка, теряя свою гидратную оболочку, взамен координируясь карбонильными группами из петель селективности белка. Катион натрия, имея меньший диаметр, плохо координируется слишком широкой порой.

Восемь кислородов карбонильных групп занимают все координационные сферы катиона калия, образуя тетрагональную бипирамиду (вспомните краун-эфиры, образующие координационные соединения с катионами и облегчающими их растворимость в органических растворителях, Рис. 2.1).

Теоретически на всем протяжении белкового канала могут располагаться четыре катиона; поскольку соседние одноименные заряды взаимно отталкиваются, то реально в канале присутствуют только не более двух катионов, занимаемая места через одного: либо 1-3, либо 2-4.

Чем обеспечивается селективность калиевого канала? Почему катион натрия, который по диаметру меньше чем катион калия примерно в 1,3 раза, практически не диффундирует через калиевый канал? (Диаметр ионов Na^+ - 0,095 нм, K^+ - 0,133 нм; относительная проницаемость $\text{K}^+/\text{Na}^+ = 10^5$). Напомним, что обязательное условие для перемещаемого иона - образовать стабильный комплекс внутри белкового канала. Меньший радиус не позволяет катиону натрия образовать комплексное соединение внутри канала, а значит и пройти через канал. Если произойдет точечная мутация в селективном фильтре, то потеря избирательности канала может привести к гибели клетки.

Антибиотики – ионофоры

Определим сначала общее понятие – что такое *антибиотик*, поскольку в некоторых случаях термин антибиотик употребляется не совсем корректно, часто в расширительном смысле.

Антибиотики – это вещества, которые токсичны для бактерий. Обычно антибиотики являются естественными продуктами метаболизма микроорганизмов или растений, т.е. природными средствами защиты или войны. Благодаря успехам медицинской химии появились полусинтетиче-

ские и синтетические антибиотики: первые являются химическими производными природной структуры, а вторые получены заново и природных аналогов не имеют.

Антибиотики вызывают либо цитостатический, либо цитотоксический эффекты. Антибиотик-цитостатик обратимо ингибирует жизнедеятельность бактерий; если его убрать из среды, бактерии вновь смогут жить и размножаться. Напротив, цитотоксический антибиотик необратимо ингибирует жизнедеятельность бактерий, поэтому бактерии погибают. Проведение курса терапии цитостатиками и цитотоксическими антибиотиками отличается.

Вещества, которые токсичны для клеток эукариот, называются токсинами, ядами, антипролиферативными веществами и проч. Антибиотики не следует путать с противораковыми препаратами (химиотерапия) или противовирусными препаратами. Путаница возникает по следующей причине. При лечении вирусных и раковых заболеваний антибиотики используются только как сопутствующая антибактериальная терапия. В некоторых случаях, когда химическое соединение является ингибитором процессов размножения, общих для всех живых систем, например, репликации ДНК (см. далее), то препарат на его основе может быть либо антибиотиком, либо антираковым препаратом, либо противовирусным препаратом; его конкретное действие будет зависеть только от фармакодинамики, т.е. от конкретных физиологических особенностей заболевания.

Вернемся к частному случаю - транспорту ионов; антибиотики, которые вносятся в этот процесс, называются *ионофорами* (греч. *phoros* – несущий). Ионофоры – это небольшие гидрофобные молекулы, которые частично

имитируют функцию ионных каналов, поскольку они способны встраиваться в липидный бислой бактерий за счет гидрофобных периферийных радикалов. Ионы (снаружи или внутри клетки) могут образовать координационное соединение с ионофором в мембране, что обеспечивает диффузию ионов через бислой по градиенту концентрации ионов. Другими словами, ионофоры можно рассматривать как своего рода «поры» для ионов в биологической мембране. Для живой клетки ионный состав вне клетки и внутри клетки сильно отличается; например, для катионов калия и натрия — на порядок. Такие неравновесные условия в норме обеспечиваются специальными системами *активного транспорта* (см. далее); встраивание ионофора приводит к выравниванию ионных концентраций, и бактерия гибнет.

Валиномицин - это антибиотик-ионофор, додекадепсипептид, т.е. 12-мер с нестандартными (депси-) пептидными связями, в том числе эфирными, что делает этот олигопептид стабильным к гидролизу ферментами пептидазами. Валиномицин селективно координирует катион калия (для K^+ $K_a = 10^6 M^{-1}$; в 10^5 раз больше, чем для Na^+). Катион калия координирует шесть карбонильных групп пептида в октаэдрической бипирамиде, оставляя изопропильные группы на экстерьере комплекса, что позволяет комплексу раствориться в липидном бислое (сравните с краун-эфирами, Рис. 2.1). Валиномицин захватывает ион калия на одной стороне поверхности бислоя, где концентрация иона выше; комплекс диффундирует через бислой; на другой поверхности бислоя, где концентрация иона ниже, катион калия высвобождается. Трансмембранный перенос происходит по градиенту концентрации, концентрация катиона калия в обеих сторон мембраны уравнивается, и бактерия погибает.

Грамицидин – это пример антибиотика-ионофора, который формирует канал. Димерный комплекс из двух линейных пептидов по 15 АК каждый, которые закручиваются вокруг друг друга с образованием короткой двойной спирали. Два грамицидиновых димера пронизывают бислой насквозь, образуя самый простой канал. Это неспецифический пептидный ионофор для ряда одновалентных катионов, включая протоны.

Активный транспорт

Активный транспорт – это перенос вещества против градиента концентрации; в отличие от пассивного транспорта вещества, который, по сути, является диффузией по градиенту концентрации. Перенос вещества против градиента концентрации не может быть спонтанным, такой процесс противоречит законам термодинамики: только представьте себе, что воздух в комнате в какой-то момент собрался в одном углу. Перенос вещества против градиента концентрации (другими словами повышение концентрации вещества в каком-то компартменте) требует затрат энергии. Такие процессы необходимы в преобразовании энергии в живых системах, т.е. переходе одной формы энергии в другой. Далее мы рассмотрим, как живые системы используют энергию солнца для поддержания гомеостаза.

Преобразование энергии в живых системах

Откуда живые системы берут энергию? Все живые организмы, прямо или опосредованно, создают и поддерживают свою сложную открытую систему за счет энергии Солнца. На Солнце происходят термоядерные реакции, ядра водорода (протоны) сливаются в ядро гелия-4, при этом излучаются энергия, в частности, фотоны.

Давайте отступим от традиционного описания фотосинтеза, как процесса биохимической утилизации фотонов.

Вместо этого, постараемся сформулировать некий общий химический принцип (или схему) преобразования энергии фотонов в энергию химических связей в живых системах. Это преобразование происходит в два этапа: сначала энергия света переходит в энергию разности потенциала на мембране (по типу конденсатора), которая затем переходит в энергию пирофосфатной химической связи в АТФ (пишется латиницей, читается как АТФ).

На первом этапе энергия кванта света расходуется для разделения зарядов, чтобы сформировать разность потенциалов на мембране. Такой трансмембранный потенциал можно создать путем направленного активного транспорта заряженных ионов, например, протонов, через мембрану против градиента их концентрации. Такой транспорт обеспечивает молекулярный протонный насос, который принудительно переносит («перекачивает») протоны с одной стороны мембраны на другую, тем самым повышая их концентрацию с одной стороны мембраны.

На втором этапе, созданная разность потенциалов используется в другом сопряженном процессе: спонтанном трансмембранном переносе протонов в обратную сторону, уже по градиенту концентрации, через другой канал - белковую субъединицу фермента АТФ-синтетазы. АТФ-синтетаза – это сложный белковый молекулярный мотор, который преобразует энергию спонтанного переноса протонов через канал этого белка в химическую энергию пирофосфатной связи трифосфата АТФ. Другими словами, этот фермент обеспечивает реакцию фосфорилирования ADP до АТФ.

Рассмотрим первый этап преобразования энергии на простом примере – работе фотон-зависимого протонного насоса. Одним из образцов такого молекулярного насоса является белок – бактериородопсин, который работает в бактериях. Это типичный трансмембранный белок, мем-

бранный домен которого образует канал из 7 α -спиралей. Внутри канала с белком ковалентно связан низкомолекулярный компонент – ретиналь (Рис. 4.6).

Структуру ретиналя можно условно разделить на три части. На одном конце молекулы – циклическая структура, которая нековалентно фиксируется в специальной полости канала белка; на другом конце молекулы имеется альдегидная группа. Альдегид образует основание Шиффа с аминок группой лизина белка, что ковалентно фиксирует ретиналь в трансмембранном канале. Центральная часть молекулы представлена пятью чередующимися, сопряженными двойными связями. Система сопряжения π -связей относительно легко возбуждается, что определяет взаимодействие ретиналя со светом: его окраску и фотохимические свойства. При взаимодействии с квантом света двойная связь ретиналя 11-12 изомеризуется из транс- в цис-положение, что изменяет относительное положение двух концов молекулы.

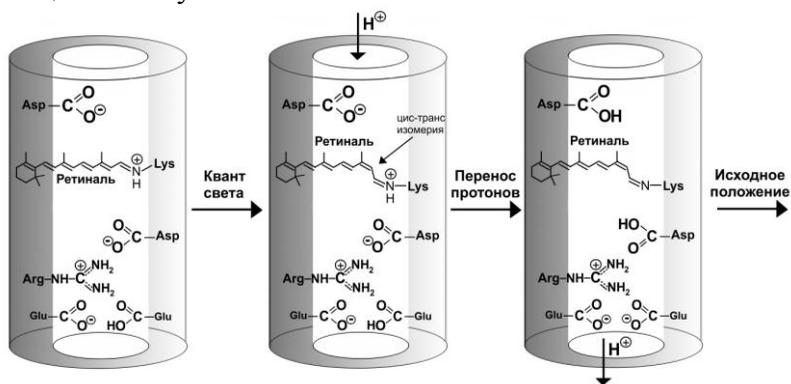


Рисунок 4.6. Схематическое представление работы бактериородсина. Фотоиндуцированная изомеризация ретиналя приводит к изменению конформации белка, что облегчает перенос протона на новый остаток Asp.

Поскольку один конец фиксирован в полости белка, изомеризация приводит к перемещению другого конца молекулы - основания Шиффа. Азот основания Шиффа имеет неподеленную пару электронов и поэтому способен легко присоединять протон с образованием четвертичного катиона аммония.

Таким образом, при поглощении кванта света протон механически перемещается в составе кватернизованного азота в трансмембранном канале только в одном направлении и такое перемещение не зависит от концентрации протонов по обе стороны мембраны. Другими словами, ретиналь выполняет функцию рычага протонной помпы, обеспечивая работу по переносу протона, на которую расходуется энергия кванта света.

Для того, чтобы создать цепочку передачи протона по трансмембранному каналу белка нужна серия доноров и акцепторов, которая обеспечивает кислотно-основные реакции. На входе и выходе из канала расположены карбоксильные группы боковых радикалов двух аспарагиновых кислот (Asp); они могут легко акцептировать протоны из среды, а затем их отдавать путем диссоциации. Таким образом, суммарный процесс трансмембранного переноса протона в одном направлении можно описать следующим молекулярным механизмом работы протонного насоса.

С одной стороны мембраны, на входе в насос, на первом шаге протон взаимодействует с карбоксилат-анионом бокового радикала первого остатка аспарагиновой кислоты (Asp1); внутри канала Asp1 расположен рядом с азотом основания Шиффа (ретиналя). На втором шаге протон с карбоксилата Asp1 переходит на азот с образованием четвертичного аммониевого катиона. При поглощении кванта света происходит цис-транс изомеризация ретиналя, что вызывает перемещение четвертичного аммониевого катиона и его сближение со вторым карбоксилат-анионом Asp2

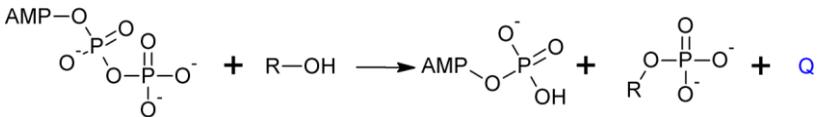
на выходе из протонного насоса по другую сторону мембраны.

Таким образом, на трансмембранный перенос одного протона тратится энергия одного кванта света. Перенос протонов осуществляется довольно быстро, за 1-100 мс, и приводит к возникновению разности потенциала в 70 мВ.

Если принять во внимание, что биологическая мембрана очень тонкая, около 7-8 нм, то градиент разности потенциалов в привычном нам масштабе будет колоссальный - около 100 кВ/см, что примерно в 10^5 раз больше, чем для обычной бытовой батарейки типа АА.

Во что преобразуется такая значительная разница потенциалов? В энергию пирофосфатной связи АТФ. Энергия Гиббса для реакции гидролиза пирофосфатной связи составляет от -29 до -63 кДж/моль: что позволяет пирофосфату АТФ участвовать во многих обменных реакциях по сопряженным механизмам:

Синтез АТФ в клетке осуществляет белковый мультисубъединичный комплекс - АТФ-синтетаза (Рис. 4.7). Это *bona fide* (т.е. самая настоящая) молекулярная вращательная динамо-машина (электрогенератор).



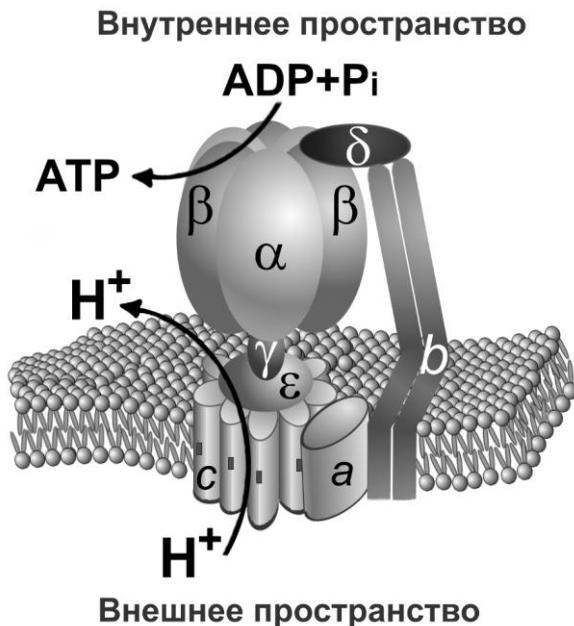


Рисунок 4.7. Устройство АТФ-синтетазы: белок катализирует энергозатратный синтез АТФ используя электрохимический потенциал, создаваемый разностью концентраций протонов на разных поверхностях липидного бислоя.

Примитивная динамо-машина (например, динамо для велосипедной фары) состоит из катушки с проводом, вращающейся в магнитном поле, создаваемом статором. Энергия вращения, согласно закону Фарадея, преобразуется в переменный ток. Если использовать щёточно-коллекторный узел для инвертирования изменяющейся полярности, то на выходе получается пульсирующий постоянный ток.

АТФ-синтетаза состоит из двух белковых комплексов – F1 и F0, каждый из которых состоит из нескольких белковых субъединиц. F0 – это трансмембранный белковый комплекс с функцией протонного канала, а F1 – это белковый комплекс для синтеза АТФ. Отдельный супердомен F0 состоит из 10-15 субъединиц одного типа, которые образуют трансмембранный домен – кольцо, который играет функцию ротора. F1 построен из разных белковых субъединиц: α , β , γ , δ и ϵ . Каталитическая часть F1 построена из тримера, в котором чередуются α и β субъединицы, т.е. структура типа $(\alpha\text{-}\beta)_3$. γ -Субъединица образует вращающийся центральный стержень, который вставлен в оба ротора F0 и F1. Когда доминирует ротор F0, то энергия переноса протонов используется для вращения ротора γ F1 по часовой стрелке, что обеспечивает синтез АТФ. Когда доминирует ротор γ F1, то он использует энергию гидролиза АТФ, чтобы вращать ротор F0 в обратном направлении, против часовой стрелки, что переносит протоны против градиента концентрации.

Белок ϵ переключает функцию F1 с синтеза АТФ на гидролиз АТФ до ADP и P_i (фосфат). Переход между двумя равновесными конформациями белка ϵ , сжатой и развернутой, происходит с помощью ADP. Белок ϵ взаимодействует с F1 и ингибирует АТФазную активность, т.е. выключает процесс гидролиза АТФ. При этом АТФ-синтетазная активность F1 не ингибируется, синтез АТФ не останавливается.

Каким образом перенос протонов сопрягается с синтезом АТФ? Перенос протонов через F0 заставляет ротор вращаться, что вызывает конформационные изменения в α и β F1. Сначала они “открываются” для взаимодействия с двумя субстратами - ADP и P_i , затем следует переход комплекса в “закрытую” конформацию и далее – в “сжатую” конформацию, которая обеспечивает образование ковалентной связи, т.е. синтез АТФ. После того, как реакция

завершится, продукт (АТФ) уже не может иметь те же контакты с ферментом; это приводит к диссоциации АТФ из комплекса и фермент возвращается в исходное состояние. Скорость работы фермента – около 100 молекул АТФ/сек, что позволяет поддерживать довольно высокую концентрацию АТФ внутри клетки - от 1 до 10 мМ.

В человеческом организме происходит постоянный оборот АТФ, его синтез и расход в многочисленных обменных реакциях. Количество АТФ в человеческом теле - около 0,2 молей, то есть около 100 г. Ежедневные потребности человека в АТФ составляют около 100 – 150 молей, т.е. около 50 – 75 кг (масса человека!). Это означает, что цикл синтеза-расхода каждой молекулы АТФ повторяется около 500-750 раз в день.

Биоэнергетика

Процессы преобразования различных форм энергии в клетке изучает специальный раздел знания, который называется биоэнергетикой.

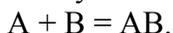
Не следует путать с вульгарным и лженаучным употреблением похожих терминов в быту и прессе.

Биоэнергетика исследует термодинамику живых открытых систем, которая количественно описывает химические процессы в клетке, в том числе связанные с превращением одних видов энергии в другие, например, энергию электрического потенциала в энергию химической связи.

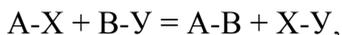
Попробуем ответить на вопрос – почему одним из ключевых моментов превращения энергии в клетке является синтез АТФ? Краткий ответ следующий: пирофосфатная связь в АТФ достаточно реакционноспособна. В этом смысле АТФ можно рассматривать как универсальный реакционный модуль, который участвует во многих молеку-

лярных процессах клетки. С другой стороны, пирофосфатная связь не столь реакционноспособна; спонтанный гидролиз водой происходит достаточно медленно, чтобы обеспечить относительную стабильность в клетке.

За счет чего химические реакции в клетке могут проходить в мягких условиях: в водной среде, при нормальном давлении и умеренной температуре? Дело в том, что в клетке практически не происходит реакций прямого синтеза по типу



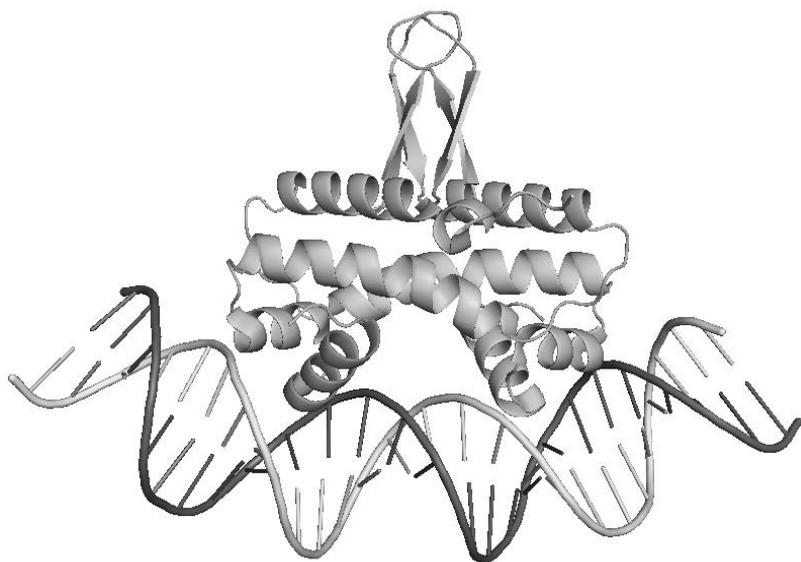
Такие реакции могут потребовать больших затрат энергии. Вместо реакций прямого синтеза, для создания новых химических соединений в клетке идут *обменные реакции*:



и реагенты здесь подобраны так, что реакция не требует существенных затрат энергии. Таким образом, вместо больших энергетических эффектов, характерных для реакций прямого синтеза, обменные реакции, в подавляющем большинстве, протекают мягко, с небольшими тепловыми эффектами.

Рассмотрим несколько примеров. В первом примере, реакции синтеза сложного эфира, если смешать спирт (например, раствор глюкозы) и ортофосфорную кислоту (P_i), то реакции не произойдет, поскольку на образование сложноэфирной связи требуется затратить много энергии. Во втором примере, реакции гидролиза АТФ до АДФ и P_i , гидролиз фосфоангидридной связи происходит спонтанно в мягких условиях. Если рассмотреть третью реакцию – взаимодействие спирта (например, раствора глюкозы) и АТФ, то такая реакция будет напоминать реакцию гидролиза, только гидроксил для атаки фосфата будет предоставлен не водой, а спиртом; реакция будет называться алкоголизом. Алкоголиз АТФ, как и гидролиз, также прохо-

дит в мягких условиях; энергия, необходимая для реакции алкоголиза может быть вычислена как сумма энергий для двух первых реакций. Для первой реакции прямого синтеза изменение стандартной энергии Гиббса будет +13,8 кДж/моль, для реакции гидролиза АТФ – эта величина будет отрицательной - 30,5 кДж/моль, поэтому для реакции алкоголиза, как для суммы первых двух реакций, эта величина также будет отрицательна – 16,7 кДж/моль. Этот простой пример наглядно демонстрирует, каким образом энергия химической связи пиррофосфата, универсального реакционно способного модуля АТФ, используется для синтеза новых соединений.



Раздел II.
Информационные потоки в клетке.

Во втором разделе мы рассмотрим информационные потоки в клетке. В определение сложной системы входит положение о том, что элементы системы связаны друг с другом материальными и информационными связями. Что же это такое?

В кибернетике теория самовоспроизводящихся автоматов требует наличия не только составных частей для конструирования копий автоматов, но и информационной программы для их сборки и функционирования. Эти утверждения, сделанные для общих систем, оказываются справедливыми и для живой клетки.

Для описания информационных процессов в клетке удобно пользоваться аналогией с информационными процессами в компьютерах. Нам предстоит ответить на многие вопросы, обычные для компьютерных пользователей. Каким образом записана информация и программы для клеточного «генетического компьютера»? Как они реализуются в пространстве и времени? Как они регулируются в зависимости от меняющихся условий? Какие сбои в программах происходят, к чему это приводит? Какие вирусы поражают клеточные «генетические компьютеры», к чему это приводит?

Второй раздел включает три главы, с пятой по седьмую, и описывает основные информационные процессы: копирование (дубликацию) генетической информации исходной клетки для передачи ее в две дочерние клетки, реализацию «основной догмы молекулярной биологии»: передача информации по цепочке ДНК – РНК – белок. Генетическая информация, записанная в генах (ДНК), сначала переписывается в копии (РНК), а затем преобразуется в последовательность аминокислот белка. Исходным носителем (и хранителем) генетической информации в клетке является ДНК; именно с описания ее структуры мы и начнем изучение информационных потоков.

Глава 5

Структура нуклеиновых кислот, ДНК

Нуклеиновые кислоты (НК) представляют собой высокомолекулярные, линейные, направленные, информационные биологические макромолекулы – полинуклеотиды. Повторяющимся звеном НК является нуклеотидный остаток.

Также, как и для белка, термин «повторяющееся звено» не следует путать с термином «мономер». НК синтезируются поликонденсацией из активированных производных нуклеотидов – нуклеозидтрифосфатов.

Различают два типа НК – дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), которая состоит из дезосинуклеотидов, и рибонуклеиновая кислота (РНК), которая состоит из рибонуклеотидов. В этой главе мы рассмотрим структуру ДНК. Структура РНК будет обсуждаться в главе 7 «Трансляция генетической информации, биосинтез белка».

Химическая структура ДНК

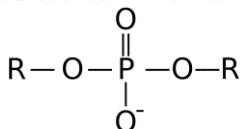
Аббревиатура ДНК состоит из трех букв, которые имеют следующее происхождение.

Н – происходит от слова нуклеин (лат. *nucleus* - ядро). В 1869 г. Ф. Мишер выделил из лейкоцитов гноя вещество, которое назвал нуклеин.

Самое удивительное, что это нуклеин содержал фосфор, что было очень необычно для органических природных соединений.

К – происходит от слова кислота, поскольку в составе нуклеина была обнаружена ортофосфорная кислота. Позже

было показано, что ДНК - это линейный сополимер ортофосфорной кислоты и спирта. Поскольку ортофосфорная кислота является трехосновной, то в линейном неразветвленном сополимере используются только две кислотные группы; третья свободная кислотная группа легко диссоциирует на анион двузамещенного фосфата и протон. Таким образом, ДНК представляет собой полиэлектролит - полианион, каждое повторяющееся звено которого заряжено отрицательно. Поскольку в клетке присутствуют катионы (больше всего катионов K^+ ; 0,14 М раствор), то ДНК существует в виде соли, а не свободной кислоты. Противоионы калия экранируют отрицательно заряженные фосфаты, уменьшая тем самым отталкивание соседних одноименных зарядов. Таким образом, аббревиатура ДНК (точнее буква К) не совсем точно отражает реальную химическую структуру ДНК в клетке - это не кислота, а соль.



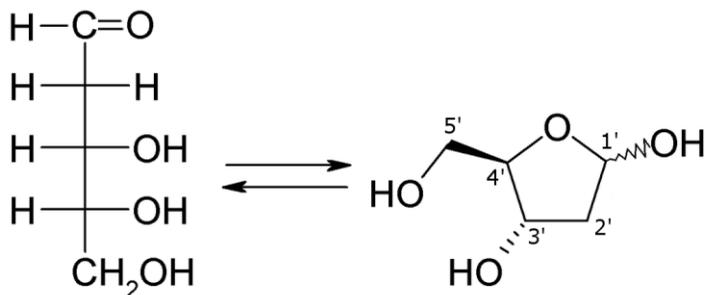
Почему для построения НК использована трехосновная фосфорная кислота? Соплимер двухосновной серной кислоты не будет полианионом и не будет растворяться в воде (сравните с диметилсульфатом). Кремниевые кислоты (например, четырехосновная ортокремниевая кислота) из-за слабой ионизации ни сами, ни их производные, в воде не растворимы.

Д – происходит от слова дезоксирибоза; этот сахар - двухатомный спирт, который с фосфатной группой образует сополимер ДНК. Связь для повторяющихся звеньев ДНК называется *фосфодиэфирной*, поскольку это смешанный эфир фосфорной кислоты и спирта.

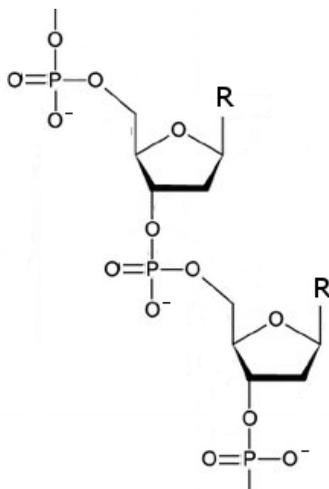
Двухатомный спирт в ДНК – циклический пятичленный сахар. Если для поликонденсации использовать простейший двухатомный спирт, который может реагировать с фосфорной кислотой, а именно - этиленгликоль, то получится симметричная макромолекула, у которой не будет *направленности* (сравните с белком). Поскольку фосфорная кислота априори симметрична, то для получения направленной макромолекулы ДНК необходим асимметричный двухатомный спирт. Проще всего асимметричные структуры создавать на основе гетероциклов, т. е. циклов, в структуру которых входят не только углеродные атомы. У 3- и 4-членных циклов структура напряжена, т. к. углы связей сильно отличаются от углов связей углерода (60° , 90° против $109,5^{\circ}$, соответственно), поэтому неудивительно, что минимальным асимметричным гетероциклическим двухатомным спиртом является 5-членный сахар. Такие циклические сахара образуются из 5-углеродных линейных сахаров - пентоз, точнее альдопентоз, имеющих 4 гидроксильные группы и 1 альдегидную группу. В структуре РНК — таким сахаром является рибоза, а в структуре ДНК – дезоксирибоза, у которой нет одного гидроксила.

Рибоза. В линейной форме рибоза имеет пять углеродных атомов, которые содержат четыре гидроксильные группы и одну альдегидную группу. При реакции концевой альдегида со второй спиртовой группой рибоза образует внутримолекулярный полуацеталь - 5-членный фуранозный цикл (см. структуры фурана, тетрагидрофурана). В РНК рибоза представлена в виде пятичленного гетероцикла, который состоит из четырёх атомов углерода и атома кислорода; цикл имеет три гидроксильные группы при первых трех атомах углерода в цикле и одну первичную гидроксиметильную группу вне цикла. Нумерация атомов углерода начинается с кислорода и продолжается по часовой стрелке: гидроксильным группам присваивается номер

атома углерода, которому они принадлежат; нумерация использует штрихи, поскольку к С1' присоединены боковые радикалы НК, азотистые основания, которые нумеруются первыми, без штрихов (см. далее).



Дезоксирибоза в ДНК, сахарофосфатный остов. Из четырех гидроксильных групп рибозы не будем пока рассматривать 1'-гидроксил, поскольку он замещен на боковой радикал - азотистое основание. В ДНК необходимый двухатомный спирт представлен дезоксирибозой, т.е. рибозой без гидроксила во втором положении: 2'-дез-окси (2'-без-окси). В результате получаем асимметричный двухатомный спирт с двумя гидроксилами в 5'- и 3'-положениях, который дает фосфодиэфирные связи с ортофосфорной кислотой, образуя сополимер ДНК. В этом случае повторяющееся звено такого сополимера - это сахар плюс фосфат, поэтому говорят, что ДНК имеет *сахарофосфатный остов*. Согласно номенклатуре сахарофосфатный остов следует писать слева направо от 5'-конца к 3'-концу.



Гетероциклические основания

Боковые радикалы в ДНК - гетероциклические основания. Сахарофосфатный остов для каждого повторяющегося звена имеет свободный 1'-гидроксил, который замещен на боковой радикал. В отличие от 20 боковых радикалов аминокислот, боковых радикалов у ДНК только четыре - это гетероциклы, сокращенно обозначаемые как А, Т, Г и С. Гетероциклические ароматические соединения содержат два атома азота. Поскольку они способны протонироваться их называют гетероциклическими *основаниями* (Рисунок 5.1).

Пятичленный ароматический гетероцикл с одним азотом называется пиррол, а с двумя атомами азота – имидазол (Im). Имидазол уже встречался в структуре бокового радикала у триптофана (Trp, W). Шестичленный ароматический гетероцикл с одним атомом азота называется пиридин, а с двумя атомами азота – пиримидин (Pu).

Нумерация атомов пиримидинов начинается с нижнего азота (N1) в приведенной проекции и далее нумеруется против часовой стрелки через N3.

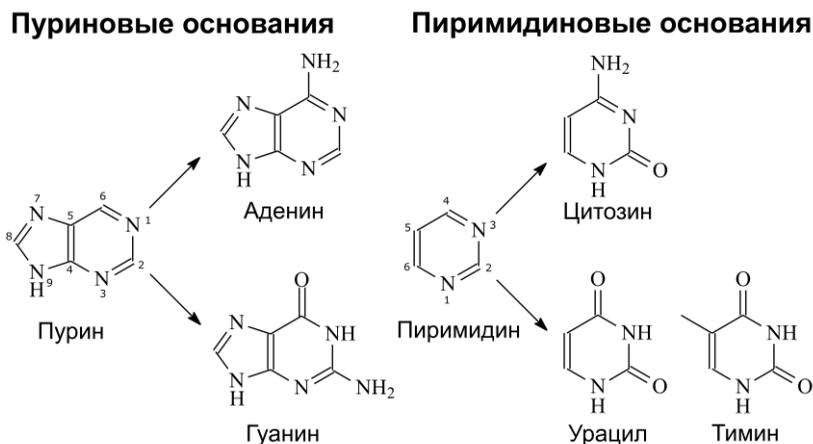


Рисунок 5.1. Гетероциклические основания нуклеиновых кислот.

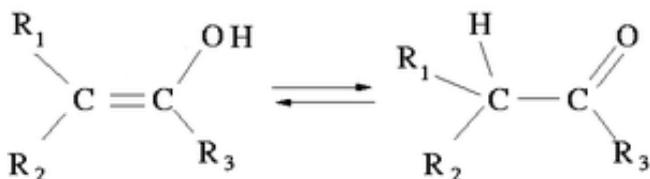
Бициклические ароматические гетероциклы, которые состоят из двух циклов: 6- и 5-членного, каждый из которых содержит два азота, называются *пурины*. Атомы пуринов нумеруют не так, как для пиримидинов: начинают не с нижнего, а бокового азота (N1) в шестичленном цикле (на «северо-востоке» в приведенной проекции) и далее нумеруют по часовой стрелке через N3; затем против часовой стрелки нумеруется пятичленный цикл: N7, C8, N9.

Пурины и пиримидины обладают ароматичностью: двойные связи делокализованы, пространственная структура плоская. Такие свойства очень важны для формирования пространственной структуры ДНК – двойной спирали.

В ДНК базовые гетероциклические основания имеют два типа заместителей, которые находятся в шестичленном

цикле, - аминогруппу и гидроксил. Расставим заместители для четырех гетероциклических оснований ДНК: двух пуринов и двух пиримидинов.

Напомним, что кето-енольная таутомерия известна из школьного курса химии, например, по реакции Кучерова: получения ацетальдегида гидратацией ацетилена. Присоединение воды по тройной связи ацетилена дает непредельный спирт - енол, нестабильное соединение, у которого гидроксильная группа при двойной связи сразу перегруппировывается в альдегид. Гидроксильные производные гетероциклических оснований таутомеризуются аналогичным образом.



Пурины в ДНК.

Аденин. Введение единственной аминогруппы при С6 (на севере в данной проекции) дает нам аденин, обозначается латинской А.

Структуру А легко запомнить, поскольку название гетероцикла и заместителя начинаются на А; кроме того, заместитель находится “наверху”. По требованию биоинформатики однобуквенные названия всех четырех гетероциклических оснований (также, как и аминокислот) необходимо писать только латиницей.

Гуанин. У гуанина два заместителя: “наверху” вместо аминогруппы гидроксил, аминогруппа находится на «юго-

западе» между двумя азотами у С2. Однако, такого енола практически нет, он существует в виде таутомерного кетона. Гуанин обозначается латинской G.

Чтобы понять и запомнить, почему у А наверху аминогруппа, а у G – кето-группа, необходимо забежать несколько вперед. Дело в том, что для образования однотипных (изогеометричных) комплементарных пар А – Т и G – С нужно исключить перекрестное взаимодействие пуринов и пиримидинов. Для этого меняются местами положения амино- и кето-групп, как доноров и акцепторов водородной связи.

Для того, чтобы однотипно присоединить к сахарофосфатному остову оба пурина, нужно использовать связь с N9 (нижний левый в данной проекции). Связь между азотом гетероцикла и С1' дезоксирибозы называется N-гликозидной.

Пиримидины в НК. Пиримидины в НК имеют каждый по два заместителя.

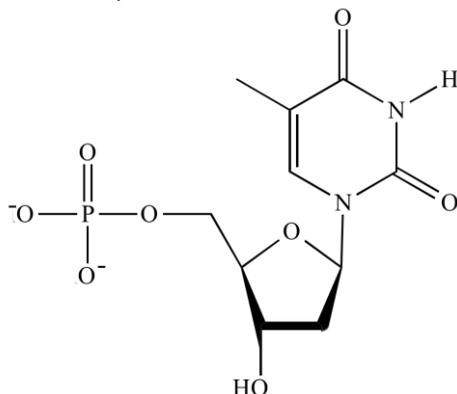
Цитозин. Положение заместителей в цитозине обратно их положению в гуанине (вспомните про комплементарную пару G-C, см. далее). Т.е. аминогруппа находится при С4 (“наверху” в данной проекции); а гидроксил – между азотами при С2, который существует в виде кетона. Цитозин обозначается латинской С.

Урацил/Тимин. В урациле два гидроксила при С2 и С4 существуют в виде кетонов. Урацил обозначается латинской U, он является боковым радикалом в РНК. В ДНК боковым радикалом является тимин – 5-метилурацил, тимин обозначается латинской T. Метильная группа является характерной “меткой”, которая отличает ДНК от РНК.

Для того, чтобы однотипно присоединить к сахарофосфатному остову оба пиримидина, нужно образовать

связь с N1 (нижний в данной проекции). Связь между азотом гетероцикла и C1' сахара называется N-гликозидной.

Повторяющимся звеном ДНК является сахарофосфат с боковым радикалом гетероциклического основания, все вместе это называется *нуклеотид*:



Макромолекула ДНК называется полидезоксирибонуклеотидом, или просто *полинуклеотидом*.

В обычной практике очень сложно оперировать полными структурными формулами, во многих случаях в этом просто нет необходимости; часто используют различные сокращенные формы записей, например, приведенные в Таблице 5.1.

Как и для белка, самой простой формой записи структуры ДНК служит текст из четырех букв, обозначающих гетероциклические основания, поскольку именно их природа определяет химические свойства конкретного повторяющегося звена в полинуклеотиде. Во многих случаях полинуклеотидная цепь ДНК обозначается просто линией, особенно для сложных пространственных моделей НК.

Таблица 5.1. Классификация мономеров и повторяющихся звеньев нуклеиновых кислот.

Гетеро-циклическое основание (ГЦ)	Нуклеозид (дезокси-рибоза + ГЦ)	Нуклеотид (фосфат + дезоксирибоза + ГЦ)
Аденин, А	Дезоксиаденозин, dA	Дезоксиаденозин монофосфат, dAMP
Гуанин, G	Дезоксигуанозин, dG	Дезоксигуанозин монофосфат, dGMP
Цитозин, С	Дезоксицитидин, dC	Дезоксицитидин монофосфат, dCMP
Тимин, Т	Дезокситимидин, dT	Дезокситимидин монофосфат, dTMP

Первичная структура ДНК

Первичной структурой ДНК называется последовательность нуклеотидов ДНК, т.е. текст, записанный 4 буквами. Нуклеотиды следует писать слева направо от 5'-конца к 3'-концу. Как и для белка, термин первичная структура ДНК имеет информационный смысл, что отличает его по смыслу от химической структуры ДНК.

Сравните: в лингвистике “слово” имеет структуру, т.е. набор букв/символов, а их определенное чередование/последовательность определяет смысл.

Благодаря асимметрии сахара полинуклеотидная цепь ДНК имеет направленность, поэтому ДНК с последовательностью нуклеотидов GAGAT и ДНК с последовательностью нуклеотидов TAGAG – это разные молекулы, как по структуре, так и по свойствам. Еще раз подчеркнем, что по требованиям номенклатуры последовательность нуклеотидов всегда пишется слева – направо от 5'-конца к 3'-концу, поэтому часто концы не обозначаются. Концы следует обозначать только в тех случаях, когда необходимо использо-

вать обратный порядок записи. Так, например, первый из приведенных олигонуклеотидов GAGAT в обратной ориентации должен быть записан как 3'-TAGAG-5'.

Методы определения первичной структуры ДНК

Общий алгоритм определения первичной структуры ДНК очень прост и аналогичен алгоритму для определения первичной структуры белка. Это метод перекрывающихся последовательностей. Вместо термина “определение первичной структуры” часто используется термин “секвенирование” (англ. *sequence* – последовательность). Также, как обычный текст разбивается на главы, абзацы, предложения, слова, так и генетический текст ДНК фрагментируется на все более мелкие части; говоря химически - полинуклеотидная цепь ДНК расщепляется на фрагменты разной длины. Но, в отличие от белка, в ДНК только 4 буквы; при расщеплении по каждой из них, получается набор многочисленных мелких фрагментов, для которых трудно найти однозначный вариант перекрывания, чтобы реконструировать исходный текст.

К счастью, в отличие от белка, химическая природа фрагментов ДНК определяет ряд преимуществ, что позволяет использовать несколько иной алгоритм чтения текста. Во-первых, полинуклеотидная цепь ДНК – это полиэлектролит, поэтому фрагменты ДНК можно разделять в электрическом поле по длине. Если это делать в блоке/пластине геля с определенным размером пор, то благодаря эффекту молекулярного сита к положительно заряженному аноду быстрее всего будут мигрировать мононуклеотиды, потом ди-, три-, тетра – и т.д. Их распределение по подвижности будет подчиняться логарифмической зависимости. Во-вторых, к одному из концов фрагмента ДНК можно ковалентно присоединить флуоресцентный краситель, тогда за миграцией фрагмента ДНК в геле мож-

но следить с помощью лазерного сканирования. Кроме того, концевая метка будет указывать и на начало читаемого текста. В-третьих, расщепление фрагмента ДНК по какой-либо букве можно проводить не полностью, а только частично. Тогда получится весь спектр фрагментов, один конец которых будет мечен флуоресцентной меткой, а другой будет оканчиваться на данную букву; степень расщепления выбирается настолько малой, чтобы ни один из фрагментов не расщеплялся в двух местах. Тогда длина фрагмента, измеряемого от флуоресцентного конца, будет определяться положением данной буквы; а набор длин фрагментов будет определяться всеми положениями данной буквы.

Рассмотрим пример.

Фрагмент *СТАССАGАGААGАТТАСС, меченный по 5'-концу красителем, расщепляется случайным образом и в очень малой степени по С. Получается набор меченых фрагментов: *С — 1, *СТАС — 4, *СТАСАС — 6, *СТАССА — 7, *СТАССАGАGААGАТТАС — 19, *СТАССАGАGААGАТТАСС — 20, где цифра обозначает длину фрагмента. Другой набор фрагментов, содержащий 3'-конец просто “не виден”, т.к. на нем нет красителя. После разделения в геле получаем набор окрашенных фрагментов с длинами 1, 4, 6, 7, 19 и 20; поскольку измерение длины фрагмента происходит с одного конца, то длина фрагмента прямо соответствует позиции С от 5'-конца: *СNNCNCNNNNNNNNNNCC. Аналогичным образом проводят анализ для остальных трех букв. Если для каждой буквы использовать свой краситель, то можно в 4 отдельных пробах провести частичное расщепление по каждой букве, а затем проанализировать все образцы вместе в одном геле, сканируя одновременно на 4 длинах волн. В этом случае получается информация о последовательности всех 4 нуклеотидов.

В настоящее время для секвенирования используются роботизированные станции, которые сосредоточены в специальных сервисных центрах, где можно заказать секвенирование на коммерческой основе. Разработка новых алгоритмов и их инструментальное воплощение происходит очень быстро, что позволяет секвенировать массово и с небольшими финансовыми затратами. Так, например, первый мега-проект секвенирования генома человека, т.е. определение последовательности нескольких миллиардов нуклеотидов ДНК всех хромосом, в самом начале был очень затратным как по ресурсам (ее выполнял международный консорциум ведущих индустриальных стран), так и по стоимости (сравнимой с космическими программами). В настоящее время, благодаря очень быстрому развитию новых методов секвенирования (т.н. секвенирование нового поколения) затраты сильно сократились.

По образному сравнению одного из американских специалистов стоимость первых проектов была сравнима со стоимостью авианосца, а сейчас стоимость секвенирования генома человека сравнима с ценой на простенький скутер.

Секвенированы многочисленные геномы вирусов и всех трех царств/доменов живого: археобактерий, бактерий и эукариот, включая млекопитающих и растений. Вопросы *геномики*, науки о геномах, будут изложены в девятой главе. Здесь укажем только на одну из основных задач в геномике – научиться анализировать колоссальный массив генетической информации, который сосредоточен в компьютерных базах данных (БД), который получил специальное название – «большие массивы данных» (англ. Big Data). Также, как для белка, сбором, хранением, распространени-

ем и анализом данных по первичной структуре ДНК занимается специальный раздел науки – биоинформатика.

Пространственная структура ДНК

Вторичная структура ДНК – двойная спираль. В отличие от белков, кристаллы макромолекулы ДНК получить не удастся, поэтому ее пространственная структура оставалась неизвестной до 1952 г. Благодаря усилиям четырех ученых в Великобритании (Р. Франклин, М. Уилкинса, Д. Уотсона и Ф. Крика) удалось построить модель пространственной структуры ДНК, которую назвали “двойная спираль”. Значимость этого открытия состоит не столько в определении структуры ДНК как таковой, как в том, что структура двойной спирали ДНК достаточно просто и наглядно объяснила основное свойство “живого” – каким образом при делении клетки каждая из двух дочерних клеток получает от материнской клетки две точные копии исходной макромолекулы ДНК (см. следующую главу).

В двойной спирали ДНК два полинуклеотида (иногда пользуются термином *тяж* ДНК) закручены друг относительно друга, образуя плектонемическую спираль, т.е. спираль, цепи которой можно разделить только после полного раскручивания. Контур спирали определяется конформацией сахарофосфатного остова; гетероциклические основания, как боковые радикалы, находятся внутри спирали и располагаются друг против друга, образуя т.н. *комплементарные пары* оснований. Тем самым, двуспиральная структура ДНК принципиально отличается от α -спиральной структуры белка, для которой боковые радикалы располагаются снаружи спирали, по ее периферии.

Пары гетероциклических оснований упакованы в спирали очень плотно, поэтому Э. Шредингер образно назвал ДНК “одномерным кристаллом”. И действительно, диаметр двойной спирали (примерно 2 нм) намного меньше

340 нм - длины тысячи пар нуклеотидов (средняя длина одного гена): высота витка спирали составляет 3,4 нм, а на один виток приходится 10 пар нуклеотидов. При равномерной спиральной закрутке каждая последующая пара оснований должна поворачиваться относительно предыдущей на 36° . Расстояние между парами гетероциклических оснований – 0,34 нм, что примерно соответствует их “толщине”. Модель напоминает стопку костяшек домино, где каждая пара оснований – это одна костяшка, у которой каждая из двух половинок костяшки – гетероциклическое основание комплементарной пары. Костяшки лежат друг на друге и каждая последующая костяшка домино повернута относительно предыдущей на 36° .

спираль ДНК



спираль белка

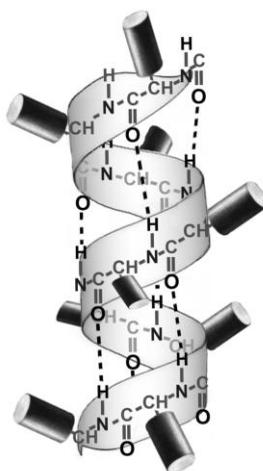


Рисунок 5.2. Сравнение двойной спирали ДНК и α -спирали белка. В ДНК боковые радикалы скрыты внутри спирали, а в α -спирали белка – наружу.

Гетероциклические основания двух цепей образуют т.н. *комплементарные пары* оснований, которые связаны друг с другом водородными связями.

В домино две половины одной костяшки составляют одно целое и поэтому «связаны ковалентно», в ДНК гетероциклические основания связаны нековалентно, водородные связи могут разрушаться при определенных условиях.

Структура комплементарных пар показана на рис. 5.3. Обратите внимание на положение заместителей в гетероциклических основаниях, которые мы расставляли ранее в предыдущем разделе (кетогруппы и аминокислотные группы): положения доноров и акцепторов водородной связи четко соответствует друг другу. Так, например, становится понятным “обратный порядок” чередования кетогруппы и аминокислотных групп у G и C. (Это обстоятельство существенно облегчает запоминание природы и расположения заместителей).

Пара А-Т имеет 2 водородные связи, а пара G-C – три. Очень важным свойством комплементарных пар является их *изогеометричность*: если наложить контур одной пары на другой, то положение гликозидных связей совпадет. Поскольку пары уложены в стопки перпендикулярно оси спирали, то их изогеометричность обеспечивает постоянный диаметр спирали, равный 2 нм, независимо от порядка чередования комплементарных пар, т.е. независимо от первичной структуры ДНК. Расстояние между парами вдоль оси спирали соответствует “толщине” ароматической пи-системы гетероциклического основания. Взаимодействие ароматических пи-систем друг с другом называется *стэкинг-взаимодействием* (англ. *stack* – стержень колонны).

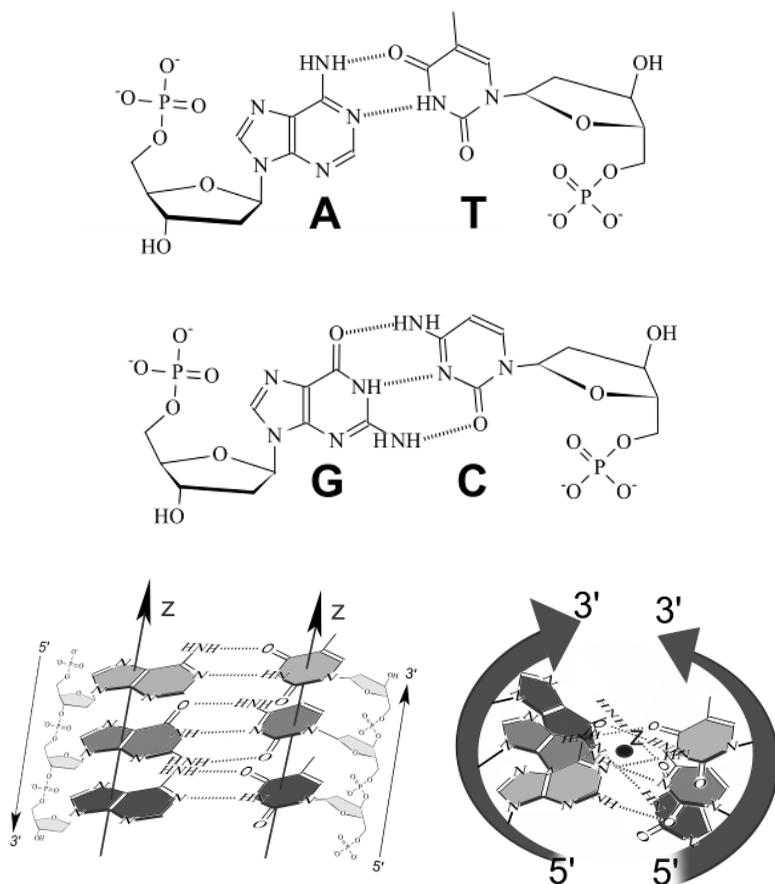


Рисунок 5.3. Вверху - комплементарные пары ДНК: A=T и G=C. Внизу - схематическое изображение укладки цепей в двойной спирали: вид с боку (слева) и с торца (справа).

В итоге, структура двойной спирали ДНК напоминает 10 фишек домино, каждая из которых имитирует комплементарную пару (у фишки 2 поля), положенных друг на

друга с поворотом в 36° , поскольку на 1 виток спирали приходится 10 пар.

Структура двойной спирали ДНК полностью отвечает принципу биологической целесообразности. Наружное расположение гидрофильных сахарофосфатных цепей обеспечивает хорошую гидратацию и растворимость ДНК, в то время как плотная упаковка гетероциклических боковых радикалов внутри спирали обеспечивает химическую стабильность гетероциклических оснований и, следовательно, надежное хранение генетической информации, записанное в первичной структуре ДНК.

Две цепи ДНК противонаправлены: одна цепь идет в направлении от 5'- к 3'-концу, в том же направлении другая цепь идет от 3'- к 5'-концу. Такое свойство структуры ДНК имеет критическое значение для процессов воспроизведения и передачи генетической информации (см. следующую главу).

Сравним спиральные структуры белка и ДНК. Структура α -спирали белка принципиально отличается от двойной спирали ДНК. α -спираль белка одностежковая, а двойная спираль ДНК двустежковая. α -спираль белка стабилизирована водородными связями, образованными донорами и акцепторами пептидных связей основной цепи макромолекулы, а двойная спираль ДНК стабилизирована водородными связями боковых радикалов гетероциклических оснований. Полипептидная цепь белка неполярна и плохо гидратируется, боковые радикалы цепи расположены снаружи спирали, их свойства определяют уникальную третичную структуру белка (конформацию белка). В двойной спирали все наоборот: две гидрофильные сахарофосфатные цепи расположены снаружи двойной спирали, обеспечивая хорошую гидратацию и растворимость, а гидрофобные гетероциклические основания спрятаны внутри. Можно предположить, что такие крайние различия в структуре белка и

ДНК связаны с существенной разницей в функции этих макромолекул. Основная функция белков – вступать в разного рода взаимодействия, разнообразие и специфичность этих взаимодействий обеспечиваются 20 различными боковыми радикалами аминокислот. Основная функция ДНК – это хранение и передача генетической информации, которая записана в последовательности гетероциклических оснований, которые плотно упакованы внутри двойной спирали, образуя «одномерный кристалл».

Денатурация и ренатурация двойной спирали ДНК

Денатурация ДНК. Процесс конформационного перехода одной молекулы двойной спирали ДНК в две одотяжевые молекулы с конформацией статистического клубка называется *денатурацией* (*де* – приставка, обозначает отрицательное действие). Нативная конформация ДНК обозначается как N (англ. *nature* – природная, нативная), денатурированная ДНК обозначается как D (англ. *denature* – не природная, денатурированная).

Как экспериментально проследить за процессом денатурации? Наиболее показательный физический параметр, который отличается для растворов нативной и денатурированной ДНК – это вязкость раствора. Двойная спираль – это довольно жесткая палочка и ее вязкость больше, чем вязкость раствора денатурированной конформации статистического клубка, повторяющиеся звенья которого могут свободно вращаться благодаря степеням свободы фосфодиэфирной связи. ДНК можно денатурировать различными способами, например, нагреванием, которое усиливает подвижность звеньев, приводя, в конце концов, к разрушению как стэкинг-взаимодействий, так и водородных связей, что приведет к расплетанию двойной спирали и самостоятельному поведению двух ее тяжей, которые перейдут в конформацию статистических клубков. Если нагре-

вать раствор ДНК и измерять его вязкость, то по мере возрастания температуры амплитуда колебания звеньев возрастает, спираль начинает “дышать”, но при этом вязкость, как макроскопический параметр, остается постоянной или меняется очень незначительно. При определенной повышенной температуре энергия колебания гетероциклических оснований станет больше, чем энергия стэкинг-взаимодействий и водородных связей, и комплементарные пары начнут расходиться. Двойная спираль разрушится, причем это произойдет практически одновременно (как расходится застежка-молния) и в узком интервале температуры. В этом смысле плавление ДНК называется *кооперативным процессом*.

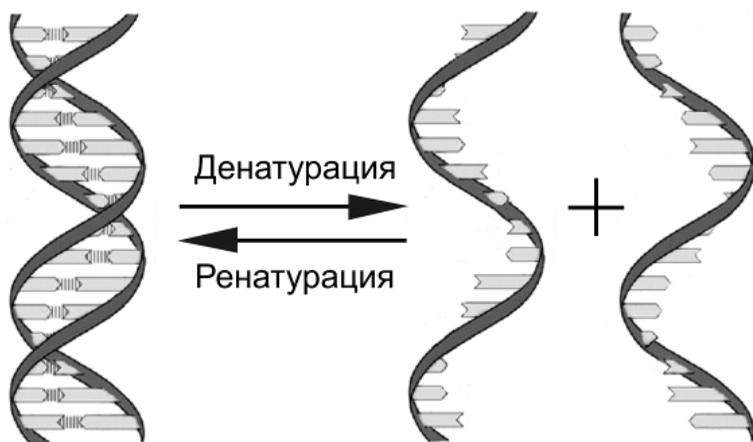


Рисунок 5.4. Денатурация и ренатурация ДНК – обратимые разрыв и образование водородных связей.

На диаграмме зависимости вязкости от температуры изменение вязкости произойдет скачком и будет внешне похоже на плавление кристалла, поэтому температурная

денатурация ДНК была названа “плавлением ДНК”. Температура середины интервала перехода N-D называется “температурой плавления” - $T_{пл}$.

$T_{пл}$ зависит от нуклеотидного состава ДНК, поскольку температурная стабильность пар G-C выше, чем пар A-T, $T_{пл}$ линейно зависит от содержания пар G-C. Если какой-то участок ДНК состоит из достаточно протяженных блоков пар A-T, то в плавлении такой ДНК можно наблюдать ступень, когда при сохранении двойной спирали существует частично денатурированный участок с разрушенными парами A-T. Частичная денатурация (или деспирализация, или “расплетание”) наблюдается в процессах передачи и реализации/экспрессии генетической информации с участием ДНК (см. следующую главу).

Ренатурация ДНК - это процесс, обратный денатурации, при котором происходит восстановление структуры двойной спирали из двух однотяжевых комплементарных полинуклеотидов. Если смешать достаточно протяженные однотяжевые комплементарные ДНК в конформации статистического клубка при комнатной температуре, то очевидно, что ренатурации не произойдет. Два тяжа должны не просто столкнуться и сблизиться, но и взаимно ориентироваться таким образом, чтобы все комплементарные основания оказались друг против друга, что приведет к образованию идеальной двойной спирали; простая интуиция подсказывает, что вероятность такого процесса близка к нулю.

Однако, вполне возможно, что случайное сближение отдельных участков макромолекул приводит к образованию коротких двуспиральных участков, т.н. дуплексов, $T_{пл}$ которых близка к комнатной температуре. Рассмотрим простой пример. Для тринуклеотида, триплета, АСТ комплементарная цепь будет 3'-TGA-5'. Дуплекс образуется только в одном случае, когда все три комплементарные

нуклеотида будут находиться друг напротив друга; в остальных пяти случаях, со сдвигом на один нуклеотид вправо или влево, будут образовываться димеры благодаря случайным водородным связям, которые менее стабильны, чем канонические комплементарные. При удлинении олигонуклеотида вероятность правильного противостояния значительно снижается.

Случайные короткие комплементарные дуплексы не могут инициировать дальнейшую ренатурацию, поскольку справа и слева от них не будет комплементарных последовательностей нуклеотидов. Поэтому алгоритм образования максимально протяженных дуплексов состоит в переборе вариантов в условиях, когда обеспечивается преимущество именно протяженных идеальных дуплексов. Для этого необходимы условия, при которых существует динамическое равновесие: короткие и/или несовершенные дуплексы образуются и разрушаются до тех пор, пока не формируется самый протяженный и, следовательно, стабильный дуплекс. С ростом размеров идеального дуплекса растет вероятность полной ренатурации всей ДНК. Температурная ренатурация ДНК была названа *отжигом* (вероятно, по аналогии с металлургическим процессом). Температура отжига должна быть чуть меньше $T_{пл}$ ДНК, что обеспечивает возможность перебора случайных дуплексов: их образования и разрушения. Сложность ренатурации ДНК легко представить наглядно, на примере застёжки-молнии, у которой все зубчики разные. На перебор и полную ренатурацию протяженных ДНК требуется очень много времени. Время ренатурации зависит от двух критических параметров: длины ДНК и “сложности” ее первичной структуры. Влияние первого параметра мы проиллюстрировали ранее на примере тринуклеотида, триплета. Влияние второго параметра наглядно иллюстрирует ренатурация гомополинуклеотидов, например, polyA и polyU, со структурой

AAAAAAAAAA... и TTTTTTTTTT..., соответственно. При столкновении таких цепей любой случайно образованный короткий дуплекс будет правильным, комплементарным, и процесс формирования дуплекса будет продолжаться дальше, до самого конца, если будут обеспечены условия, при которых равновесие смещается в сторону образования более протяженных дуплексов.

Ренатурация широко используется как в научных исследованиях, так и в практических технологиях, например, в биотехнологии и медицине. Если взять короткий олигонуклеотид (например, 20-мер), комплементарный выбранному конкретному участку ДНК, то при его отжиге с однотяжевой ДНК получается целевой короткий дуплекс, локализованный на выбранном участке ДНК. Такой процесс называется *гибридизацией*, а используемый олигонуклеотид называется *зондом*. Зонды эффективно применяются в медицинской диагностике. Например, на принципе гибридизации работают микрочипы. На поверхность микрочипа наносится серия различных зондов, комплементарных различным целевым участкам ДНК, например, вирусным ДНК; каждый зонд наносится в определенную позицию чипа. В исследуемый образец ДНК ковалентно вводится флуоресцентная метка. Образец наносится на микрочип и проводится гибридизация, после удаления избытка образца поверхность микрочипа сканируется по флуоресценции. Положительный сигнал в данном положении чипа означает, что с данным зондом на чипе комплементарно связался образец; это означает, что образец содержит участок с заданной первичной структурой. Другими словами, если зонд комплементарен, например, вирусным генам, то образец содержит вирусную ДНК. Чипы могут определять наличие специфической ДНК не только при вирусной, но и при микробной инфекции. Такой анализ может быть использован при анализе продуктов питания на наличие ге-

нетически модифицированных организмов (ГМО). С помощью чипов проводится генетический анализ на наличие мутаций в ДНК, поскольку даже одна точечная мутация (замена одного нуклеотида) частично нарушает комплементарность ДНК к зонду, что приведет к исчезновению положительного сигнала, который был характерен для ДНК без мутации. Микрочипы с очень высокой плотностью нанесения – тысячи зондов/чип доступны коммерчески, они покрывают практически все геномы многих вирусов, бактерий и даже эукариот.

Суперспирализация ДНК

В клетке, *in vivo*, линейная двойная спираль ДНК, как правило, замкнута в кольцо. Такая структура может существовать только в том случае, если цепи в двойной спирали ДНК противоположны. Если взять линейную двойную спираль, то на ее торцах есть 3'- и 5'-концы цепей, причем для каждого полинуклеотида они разные; если ковалентно соединить 3'- и 5'-концы каждого полинуклеотида, то получается нормальная фосфодиэфирная связь, неотличимая от всех остальных, и полинуклеотид становится непрерывным, ковалентно замкнутым, а двойная спираль ДНК – кольцевой, циклической.

Что будет происходить с такой ковалентно замкнутой циклической ДНК при раскручивании самой двойной спирали, т.е. при частичной денатурации, когда комплементарные пары начнут разрушаться? Такие процессы происходят, например, при репликации или транскрипции, когда происходит матричное копирование цепей ДНК (см. следующую главу). Ответы на эти вопросы следует искать в области топологии, поскольку именно эта область математики изучает процессы структурных переходов внутри непрерывных структур.

Рассмотрим бытовую аналогию. Два человека стоят друг напротив друга и держат, каждый за свой конец, двухжильный шнур, закрученный в двойную спираль наподобие ДНК. Конец держат двумя руками, каждая рука за свой 3'- или 5'-конец троса. Один из них начинает раскручивать спираль шнура, просто раздвигая руки и концы отдельных жил в стороны. Очевидно, что при этом остальная часть шнура начнет скручиваться любым непредсказуемым образом; весьма условно назовем их «суперспиралями», в отличие от собственно двойной спирали. В топологии для замкнутой двойной спирали можно ввести понятие *топологического инварианта* или *порядка зацепления*, Lk. Топологический инвариант по определению является константой для данной пространственной структуры, что бы с ней не происходило без разрывов и поломок. Для кольцевой ДНК он связан с двумя другими геометрическими параметрами – Tw, кручение (англ. *twist* – кручение, поворот) и Wr, райзинг (англ. *writhe* – корчиться):

$$Lk = Tw + Wr$$

где Lk – топологический инвариант; Tw – общее число витков в самой двойной спирали, равное длине ДНК в количестве пар нуклеотидов деленной на 10 (количество пар на 1 виток); Wr – райзинг отражает пространственную форму молекулы двуспиральной ДНК, точнее – форму ее оси. Это топологический параметр, он показывает, сколько раз ось двойной спирали избыточно пересекает саму себя, т.е. в простейшем случае – это количество супервитков.

Формула показывает, что для замкнутой молекулы двуспиральной ДНК сумма витков и супервитков остается постоянной. Это означает, что при изменении параметров кольцевой ДНК, например, при раскручивании самой двойной спирали на один виток (разрушение 10 пар), происходит изменение формы оси двуспиральной молекулы, например, на один супервиток с обратным знаком.

Наглядный пример: если у плоской кольцевой замкнутой ДНК (*релаксированной* ДНК, $W_T = 0$) раскрутить один виток, то кольцо перейдет в восьмерку – образуется один супервиток, ему можно присвоить знак, например, положительный.

Сделаем мысленное упражнение. Возьмем линейную двуспиральную ДНК со свободными концами, раскрутим у нее один виток (частично денатурируем), зафиксируем концы, ковалентно соединим их в кольцо и отпустим. Двойная спираль восстановится, а кольцевая замкнутая ДНК образует один супервиток, но уже с отрицательным знаком, противоположным первому случаю.

ДНК в клетке, *in vivo*, имеет отрицательную суперспирализацию и обладает очень интересными свойствами: избыточная энергия суперспирализации может переходить в энергию частичной денатурации двойной спирали. Это означает, что суперскрученные ДНК легче “плавятся”, легче образуют частично денатурированные участки, легче происходит инициация репликации и транскрипции (см. далее). Однако, после того, как потенциал суперспирализации будет исчерпан и ДНК перейдет в релаксированную форму, продолжение частичной денатурации ДНК будет вызывать дальнейшее накопление супервитков, но уже с противоположным, положительным знаком. Энергия системы будет возрастать и процесс раскручивания двойной спирали ДНК остановится. Другими словами, возникающая суперспирализация будет тормозить раскручивание двойной спирали ДНК.

Поскольку процессы матричного копирования, которые происходят при репликации и транскрипции ДНК, происходят постоянно и требуют частичного раскручивания, то возникает вопрос – каким образом клетка справляется с такой тормозящей суперспирализацией ДНК *in vivo*? В быту, самый быстрый способ распутать клубок ниток –

это радикальный, разрезав нитку. В случае ДНК происходит то же самое и делают это специальные ферменты: фосфодиэфирная связь цепей ДНК гидролизуется, через разрез цепи пропускается соседний участок ДНК, чтобы убрать один супервиток, концы ДНК вновь сшиваются. Эти ферменты называются *топоизомеразами*, поскольку они превращают одни топологические формы ДНК в другие, т.е. изменяют топологический инвариант.

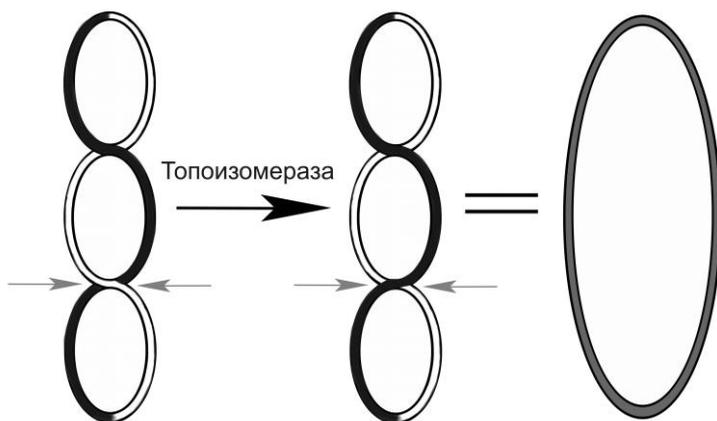


Рисунок 5.5. Суперспирализация ДНК и снятие суперспирализации топоизомеразой.

Из трех царств/доменов живого бактерии делятся быстрее всех, например, каждые 20 мин; за это же время должна удвоиться/реплицироваться вся хромосомная ДНК. Поскольку при репликации происходит раскручивание и копирование каждой из цепей ДНК, то бактерии оказались очень чувствительными к действию ингибиторов топоизомераз. Например, на основе фторхинолонов (ципрофлоксацин и др.) получены мощные антибиотики широкого спектра действия.

Глава 6

Биосинтез нуклеиновых кислот

В основе биосинтеза нуклеиновых кислот, полинуклеотидов, лежит принцип матричного пошагового копирования. В обычной химической реакции две молекулы (например, два первых мономера) сталкиваются случайно, в матричном синтезе каждая из молекул (мономеров) сначала взаимодействует с матрицей, ориентируется соответствующим образом и только после этого между молекулами происходит реакция. Матрица определяет природу каждой вступающей в реакцию молекулы (мономера), порядок их присоединения и эффективность реакции. Биосинтез полинуклеотидов катализируется ферментами, которые назвали полимеразами.

В этой главе мы разберем два аналогичных с точки зрения химического механизма процесса: репликацию ДНК и транскрипцию РНК. Оба процесса связаны с передачей генетической информации: в первом случае происходит считывание и удвоение всей информации, записанной в ДНК (хромосомах); а во втором — считывание и копирование с ДНК на РНК только части информации, записанной в ДНК. По аналогии с компьютером можно сказать, что при репликации происходит считывание и дубликация всей информации, записанной на жестком диске, а при транскрипции — считывание и копирование только отдельных файлов.

Репликация ДНК

Построение модели двойной спирали ДНК позволило просто и наглядно объяснить одно из самых важных признаков живого – точную передачу генетической информации двум дочерним клеткам при делении родительской клетки – репликацию ДНК. При этом важную роль играют

два свойства двуспиральной ДНК: комплементарность цепей и их противонаправленность. На схеме исходной родительской двуспиральной ДНК условно обозначим две цепи как W и C (фамилии Уотсона и Крика).

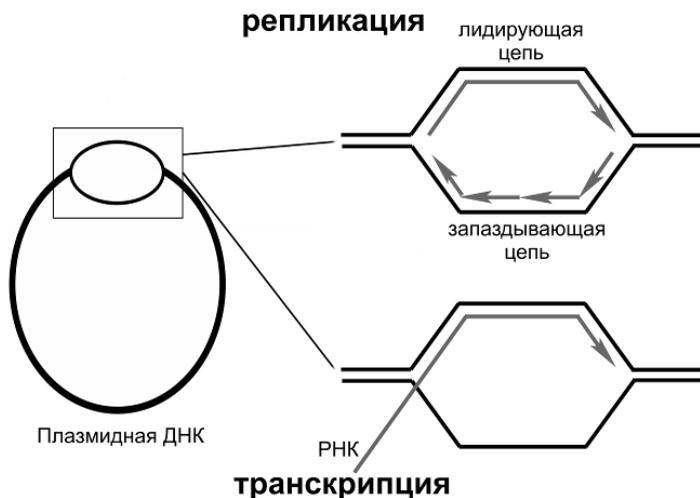


Рисунок 6.1. Общая схема репликации (вверху) и транскрипции (внизу). В качестве матричной цепи использована кольцевая ДНК (бактериальная плаزمид).

Сначала на данном участке цепи ДНК расходятся, происходит частичная денатурация. На получившемся однотяжевом участке одной цепи гетероциклические основания становятся доступными для комплементарных взаимодействий с гетероциклическими основаниями мономеров, после их ориентации происходит химическая реакция и образуется динуклеотид новой комплементарной цепи. Далее происходит наращивание одного из концов цепи шаг за шагом, нуклеотид за нуклеотидом, т.е. *рост цепи*. Аналогичный процесс происходит и на противоположной однотяжевой цепи. Легко видеть, что в результате получатся

две идентичные копии данного участка ДНК. В состав каждой из дочерних двутяжевых молекул входит одна исходная материнская цепь (матричная) и вторая цепь – новая, которая заново синтезирована. Поскольку в результате репликации получаются гибридные молекулы, то такой механизм получил название полуконсервативного.

В гипотетическом консервативном механизме одна копия дочерней ДНК полностью состояла бы из двух материнских цепей, а вторая копия ДНК состояла бы только из вновь синтезированных цепей. Такой молекулярный механизм трудно себе даже представить.

Как при любом матричном копировании сам процесс репликации можно разделить на три стадии, три этапа, а именно: инициацию, элонгацию и терминацию, другими словами - начало процесса, его продолжение и окончание.

Рассмотрим механизм репликации бактериальной «хромосомы», т.н. «плазмиды», поскольку она представляет собой единственную кольцевую ковалентно замкнутую молекулу ДНК.

Инициация синтеза ДНК

Инициация синтеза ДНК происходит в определенном районе ДНК, имеющем характерный *мотив* в первичной структуре.

Для названия района инициации репликации ДНК используют кальку с английского - *ориджин* репликации (англ. *origin* — начало). Например, единственный ориджин хромосомы кишечной палочки *E. coli* называется *oriC* (*C* от англ. *chromosome* - хромосома) - это район ДНК в 245 пар нуклеотидов с двумя участками: участком связывания белка инициации репликации (*DnaA*) и участком первоначальной

В главе 3 ранее изданного пособия «ХОБП, часть 1» (Баку, 2017) на стр. 62-63 даны краткие определения для терминов «мотив» и «паттерн». А данной главе дадим более развернутое толкование этих понятий, принятое в современной биоинформатике.

Если данный район ДНК участвует в функционировании, например, взаимодействует с белками, то такой участок называют мотивом. Например, мотив «узнается» определенным белком. Под термином «узнается» имеется в виду, что белок специфически взаимодействует только с данным участком ДНК, образование такого специфического комплекса часто называют «ДНК-белковым узнаванием» (этот феномен более подробно рассматривается в гл. 8 в разделе «Регуляция экспрессии генов», например, для промотора).

Паттерн – это характерная последовательность нуклеотидов в ДНК или РНК, которая консервативна в эволюции. Паттерн выявляется путем сравнения многих первичных структур ДНК или РНК из разных типов клеток. Хотя иногда встречаются идентичные паттерны, чаще всего существуют эволюционные различия. Например, для эволюционно разных представителей в некоторых положениях паттерна могут быть разные нуклеотиды. В этом случае говорят о консенсусных последовательностях нуклеотидов паттерна, где для каждого нуклеотида в конкретной позиции паттерна указывается частота встречаемости, такой паттерн называется профилем. Поиск мотивов, паттернов и профилей в базах данных первичных структур нуклеиновых кислот проводят с помощью специальных компьютерных программ.

Забегая вперед, отметим, что понятие «мотив» может использоваться не только для первичных структур белков и нуклеиновых кислот, но и для вторичных и третичных структур.

локальной деспирализации (DUE, англ. - *DNA unwinding element*); оба участка имеют характерные мотивы.

Несколько молекул белков DnaA специфически взаимодействуют с множественными мотивами ДНК с образованием уникального супрамолекулярного комплекса, что вызывает локальное торсионное напряжение, напряжение кручения, в ДНК. В совокупности с общей суперспирализацией хромосомы, возникающее напряжение приводит к локальной деспирализации ДНК в нескольких соседних участках DUE, $T_{пл}$ которых ниже, чем для других участков хромосомной ДНК, поскольку DUE содержат много А-Т пар.

Частичная деспирализация ДНК позволяет на каждом тяже, как на матрице, построить комплементарную цепь. Изображение в электронном микроскопе участка реплицирующейся ДНК по форме напоминает «глаз», у которого верхнее и нижнее «веко» образованы двуспиральными участками ДНК, а «уголки глаза» – это участки перехода в нерасплетенную исходную двуспиральную ДНК. В химической биологии «уголки глаз» принято называть - «репликативными вилками» (имеется в виду двузубая вилка).

Элонгация синтеза ДНК

Мономерами для синтеза ДНК являются активированные производные нуклеотидов - нуклеозидтрифосфаты, где активирующей группой является пирофосфат. Сокращенно мономеры записывают как pppN или еще короче - NTP.

Иногда ошибочно утверждается, что мономерами ДНК являются нуклеотиды (дезоксирибонуклеотиды). Правильно говорить, то повторяющимся звеном ДНК является нуклеотид, а мономерами являются NTP.

Репликация каждого из тяжей ДНК начинается с образования короткого дуплекса с коротким олигонуклеотидом, примерно 10-мером, который называется *праймером* (англ. *prime* - начало, старт); праймер имеет свободную 3'-гидроксильную группу.

Как механизм образования такого праймера, так и его точная структура в настоящем курсе не рассматриваются. Фермент, который катализирует основную реакцию ступенчатого матричного присоединения мономеров, ДНК-зависимая ДНК-полимераза, может проводить реакцию трифосфатов NTP только с 3'-гидроксильной группой уже существующего дуплекса, именно это и определяет необходимость наличия праймера, который синтезируется другим ферментом. Катализировать реакцию между двумя мономерами ДНК-зависимая ДНК-полимераза не может.

Гетероциклическое основание очередного трифосфата, NTP, образует с однотяжевой матричной ДНК комплементарную пару и его α -фосфат сближается с 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида праймера. Алкоголиз трифосфата приводит к образованию новой фосфодиэфирной связи, цепь удлиняется на один нуклеотид, уходящей группой является пирозинфосфат.

На следующем шаге реакции роста цепи снова происходит образование комплементарной пары с гетероциклическим основанием очередного мономера, снова его α -фосфатная группа сближается с 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида дуплекса, снова образуется фосфодиэфирная связь, и цепь удлиняется на один нуклеотид.

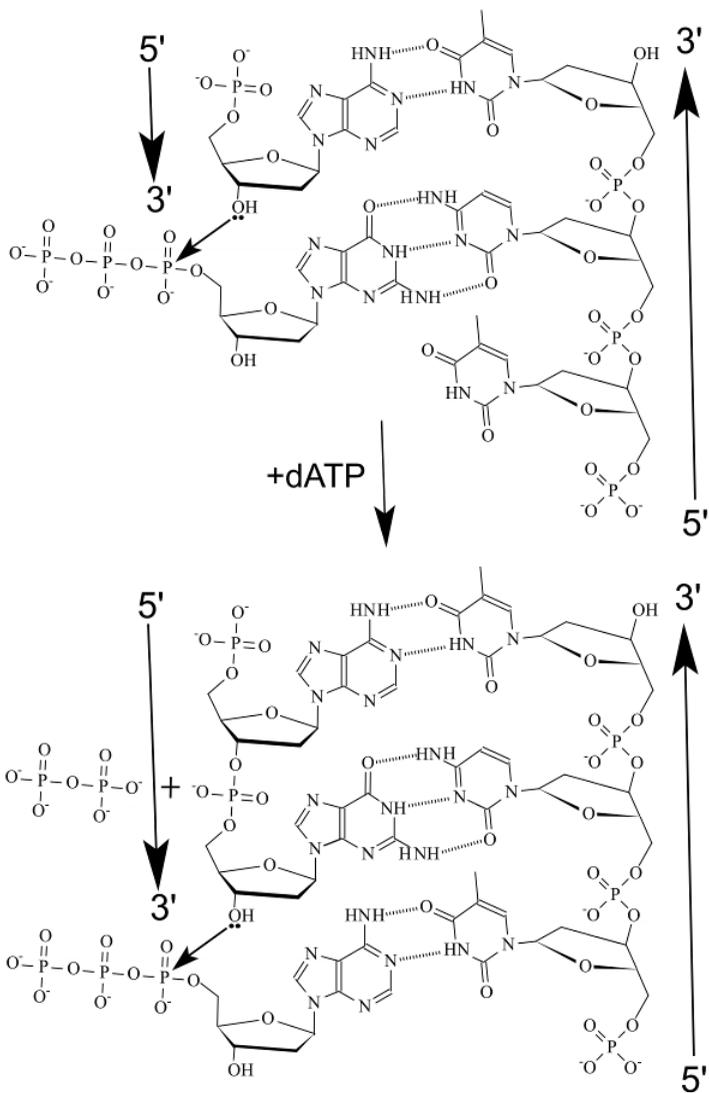


Рисунок 6.2. Реакция биосинтеза ДНК. Справа – матричная цепь, слева – синтезируемая цепь.

Механизм реакции образования фосфодиэфирной связи – это нуклеофильная атака парой электронов кислорода гидроксильной группы (частично отрицательный заряд) атома фосфора (частично положительный заряд); промежуточное соединение распадается с уходом пирофосфатной группы, PP_i (i от англ. inorganic). Формально реакцию присоединения мономера NTP к цепи можно назвать нуклеотидилтрансферазной реакцией, т.е. реакцией переноса нуклеотидила (ср. далее в биосинтезе белка с пептидилтрансферазной реакцией).

Таким образом, при ступенчатом матричном наращивании полинуклеотида «растущим концом» цепи является 3'-гидроксил и цепь растет в направлении от 5'-конца к 3'-концу.

Направление роста цепи совпадает с требованием номенклатуры написания последовательности нуклеотидов при записи первичной структуры в направлении от 5'-конца к 3'-концу.

Термодинамика реакции биосинтеза нуклеиновых кислот

Почему для реакции биосинтеза ДНК в качестве мономеров используются трифосфаты нуклеозидов? Поскольку повторяющимся звеном ДНК является нуклеотид, то представим мономер $pppN$ как активированный нуклеотид XpN . Тогда вопрос можно переформулировать так - почему пирофосфат (pp) используется как активирующая группа (X) для нуклеотида? Энергетика реакций, в которых участвует трифосфатная группа уже обсуждалась ранее в разделе о преобразовании энергии (см. главу 4). В

данном случае еще раз подчеркнем, что реакция гидроксила с трифосфатом сама по себе энергетически выгодна. Еще больше стимулируют протекание реакции дополнительные факторы, такие как: правильная пространственная ориентация реагирующих групп на матрице и катализ специальным ферментом - *ДНК-зависимой ДНК-полимеразой*. В название ДНК-полимераза добавлен термин «ДНК-зависимая» для того, чтобы подчеркнуть, что синтез определяется (зависит) матричной ДНК, т.е. фермент катализирует наращивание полинуклеотидной цепи только на 3'-конец дуплексной ДНК.

Биосинтез второй цепи ДНК

При ступенчатом матричном синтезе одной цепи ДНК происходит последовательное присоединение по одному нуклеотиду к 3'-концу растущей цепи. По мере дальнейшего раскручивания двойной спирали ДНК и обнажения все новых и новых однотяжевых участков копируемой матричной цепи в направлении ее 5'-конца, в том же направлении движется и репликативная вилка, обеспечивая непрерывное удлинение вновь синтезируемой цепи. Эта цепь называется *лидирующей цепью* ДНК.

Что же происходит на второй комплементарной матричной цепи исходной ДНК? Поскольку цепи в исходной двойной спирали ДНК противонаправлены, то вторая цепь должна копироваться в направлении, противоположном движению репликативной вилки!?

Удивительно, но в экспериментах было показано, что поскольку механизм реакции точно такой же, то растущим концом является 3'-гидроксил. Потому матричное копирование второй цепи происходит, в отличие от лидирующей цепи, в другом направлении и не непрерывно, а фрагментами (Рис. 6.1), которые получили свое название по имени открывателя – японского ученого Оказаки.

С точки зрения химического механизма реакции, так же, как и для лидирующей цепи, синтез фрагмента Оказаки на второй цепи начинается на 3'-конце олигонуклеотидного праймера. Поскольку праймер должен обеспечить синтез в противоположном направлении, он образует стартовый дуплекс на второй матричной цепи ДНК рядом со спиральным участком репликативной вилки. Это может произойти только после того, как на первой цепи уже синтезирован участок лидирующей цепи в несколько сот/тысяч нуклеотидов (эукариоты/бактерии, соответственно) с образованием дуплекса, а вторая матричная цепь стала полностью односторонней. В связи с тем, что синтез второй цепи может идти только после синтеза протяженного участка первой цепи, вторая цепь названа *отстающей*, в отличие от первой, лидирующей.

Механизм синтеза полинуклеотида остается неизменным. Гетероциклическое основание очередного трифосфата, NTP, образует с односторонней матричной ДНК соседнюю комплементарную пару, и его альфа-фосфат сближается с 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида праймера. Алкоголиз трифосфата приводит к образованию новой фосфодиэфирной связи, цепь удлиняется на один нуклеотид. На следующем шаге реакции роста цепи снова происходит образование комплементарной пары с гетероциклическим основанием очередного мономера, снова его альфа-фосфатная группа сближается с 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида дуплекса, снова образуется фосфодиэфирная связь и цепь удлиняется на один нуклеотид. Синтез отстающей цепи катализирует вторая молекула ДНК-зависимой ДНК-полимеразы.

В отличие от синтеза лидирующей цепи, который непрерывно следует за движением репликативной вилки, синтез отстающей цепи заканчивается, как только ее растущий 3'-конец «наталкивается» на предыдущий, синтези-

рованный ранее, фрагмент Оказаки. Два фрагмента Оказаки «сшиваются» (лигируются), между ними образуется стандартная фосфодиэфирная связь; катализирует эту реакцию фермент ДНК-лигаза (лат. *ligatio* – соединять).

В процессе элонгации репликации двутяжевой ДНК репликативная вилка продолжает двигаться далее; в ту же сторону продолжается непрерывное копирование лидирующей цепи. Через некий промежуток времени, когда на второй комплементарной цепи образовался протяжённый однотяжевой участок, в обратную сторону начинается синтез очередного фрагмента Оказаки отстающей цепи ДНК.

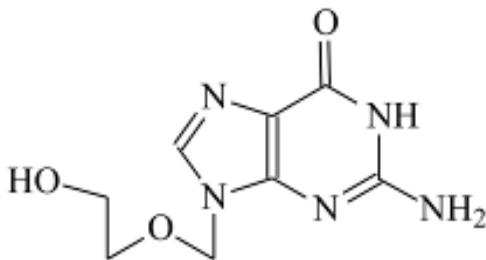
Безусловно, такой комплексный процесс, в который включены и многочисленные конформационные перестройки, и ферментативные реакции, и механические перемещения, обслуживается большим количеством белков, которые собираются на ДНК в мультисубъединичный супрамолекулярный комплекс, который получил название *реписома*.

Для того, чтобы совместить процессы синтеза лидирующей и отстающей цепей в пространстве-времени, матрица для отстающей цепи ДНК образует петлю, которая продергивается через реписому по мере синтеза фрагментов Оказаки. Иногда, чтобы подчеркнуть это обстоятельство, «репликативную вилку» называют «репликативным трембоном».

Поскольку ДНК кольцевая, то закономерен вопрос: если одна репликативная вилка движется в одном направлении, скажем, по часовой стрелке, то не может ли вторая репликативная вилка одновременно двигаться в противоположном направлении? И действительно, репликация может быть двунаправленной.

Ингибиторы синтеза ДНК – аналоги субстрата

Можно блокировать нуклеотидилтрансферазную реакцию, если добавить модифицированный субстрат, который не способен к образованию фосфодиэфирной связи. Например, если из дезоксирибозы гуанозина мысленно удалить атомы углерода С2' и С3', то получится миметик (аналог) субстрата, у которого вместо сахара будет простой эфир. Такой миметик проявил лекарственные свойства и в настоящее время, под названием *ацикловир* (ацикло, т.е. без-цикла) используется как средство против вируса герпеса, знакомого многим. В силу отсутствия гидроксильных групп, ацикловир останавливает синтез вирусной ДНК и, следовательно, размножение вируса. Формула ацикловира:



Если зараженную вирусом клетку/ткань обработать ацикловиром, то сначала вирусный фермент фосфорилирует его до ацикловирмонофосфата, а клеточные ферменты фосфорилируют дальше до ацикловиртрифосфата. Такой трифосфат реагирует с 3'-концом реплицирующейся вирусной ДНК, образуя продукт, который, в силу отсутствия гидроксильных групп, останавливает синтез вирусной ДНК и, следовательно, размножение вируса.

Терминация репликации

В простейшем случае, процесс двунаправленной репликации кольцевой ДНК бактерий завершается, когда две репликативные вилки «сталкиваются» или «объединяются»; в результате образуются две точные копии дочерних кольцевых ДНК.

Если проследить с помощью электронной микроскопии за разными стадиями репликации кольцевой ДНК, то при инициации форма ДНК напоминает «глаз», при элонгации – греческую букву тэта, а при терминации – очки.

Репликон

Репликоном называют участок ДНК, способный к репликации. В каждом репликоне обязательно должен быть ориджин, который определяет возможность репликации любой ДНК, в структуру которой он входит. Существуют кольцевые и линейные репликоны; репликация кольцевой хромосомы бактерий и была разобрана в тексте. Единственная хромосомная кольцевая ДНК бактерий – это один репликон. Поскольку ДНК каждой хромосомы эукариот примерно на два порядка больше хромосомы бактерий, то чтобы обеспечить выполнение репликации в разумные времена (скорость химической реакции роста цепи примерно постоянная), необходимо иметь большое число репликонов, т.е. эукариотические хромосомы – это многорепликонные системы.

Энзимология репликации

Репликацию ДНК осуществляет мультиферментный комплекс, названный *реплисомой*.

В химической биологии традиционно часто используются подобные составные термины, вторая часть которых образована с корнем сома (греч. soma – частица, тело); например, сплайсосома, рибосома).

В данном курсе не рассматривается множество различных белков, которые входят в состав реплисомы и которые обеспечивают все события сложного и многоступенчатого процесса репликации. В каждый момент времени состав реплисомы может несколько изменяться, в зависимости от конкретного этапа: какие-то белки присутствуют в комплексе всегда, например, ДНК-зависимая ДНК-полимераза, а какие-то белки взаимодействуют только временно, во время выполнения конкретной операции, последние называются *факторами*. Наиболее полно всех белковых участников процесса описывают базы данных, например, базы *интерактомов* (англ. *interaction* – взаимодействие, + ом). Интерактомы бывают постоянными (как рибосома) или динамическими (как реплисома).

Структура и функция белков репликации сильно отличается: раскручивание двойной спирали ДНК (частичная денатурация), стабилизация одנותяжевых участков для препятствия обратного процесса - ренатурации, синтез праймеров (коротких фрагментов РНК, с которых начинается синтез), образование «зажима» для обеспечения процессивности, собственно матричная ступенчатая полимеризация цепи ДНК, коррекция ошибок синтеза (в случае присоединения некомплементарного нуклеотида - его удаление и ре-синтез правильного), процессивность (способность к синтезу протяженных фрагментов ДНК), сшива-

ние/лигирование фрагментов Оказаки, решение топологических проблем, и проч. и проч.

Структура сложного супрамолекулярного комплекса реплисомы поддерживается множеством сильных и слабых нековалентных взаимодействий - между белками и ДНК, или между белками. Использование постоянных и сменяемых компонентов в устройстве *молекулярной машины* дает возможность гибко менять архитектуру комплекса в зависимости от выполняемого этапа синтеза ДНК; базовый надмолекулярный комплекс сохраняется, полной разборки-сборки комплекса на каждом этапе не происходит.

Рассмотрим два основных белка реплисомы. Во второй части книги («Ферменты») рассмотрены требования для катализа химических реакций - конформация фермента должна обеспечить: во-первых, правильную ориентацию реакционных центров субстратов и стабилизацию переходного состояния; во-вторых, создать особое микроокружение для реагирующих групп.

Эти же факторы играют ключевую роль в катализе репликации ДНК. Необходимо, во-первых, обеспечить точность комплементарного копирования матрицы, т.е. продукт должен быть идеальной двойной спиралью с правильными, геометрически одинаковыми (изогеометричными) комплементарными парами. И, во-вторых, в реакционном центре фермента нужно создать специфическое микроокружение для эффективного алкохолиза трифосфатов.

Структура репликативной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы консервативна в эволюции. Молекулярная модель называется «правая рука», ее субдомены называются «пальцы», «ладонь», «большой палец».

Каталитический центр расположен в «ладони»; конформационно подвижные «пальцы» взаимодействуют с матрицей, растущим 3'-концом, очередным трифосфатом, и, в случае правильного комплементарного взаимодей-

ствия трифосфата с матрицей, конформация «пальцев» меняется так, что правильный комплекс стабилизируется и образуется т.н. «закрытая» конформация («рука сжимается»).

Нуклеофильная атака гидроксильной группы гетеродуплекса α -фосфора комплементарного трифосфата происходит в «ладони», где две консервативные аспарагиновые кислоты (Asp, D) связывают два иона магния (Mg^{2+}). Один ион магния координирует два реакционных центра: гидроксильную группу растущей цепи и α -фосфатную группу присоединяемого трифосфата. Второй ион магния координирует все фосфатные группы трифосфата. Этим достигается строгая ориентация субстратов, изменение полярности атомов, что, в совокупности, обеспечивает эффективный катализ атаки неподеленной парой электронов частично отрицательно заряженной гидроксильной группы растущей цепи атома α -фосфора с частично положительным зарядом атакуемого очередного трифосфата.

В репликации участвует еще один интересный белок – «ДНК-хомут» или «скользящий хомут», который обеспечивает *процессивность* ДНК-полимеразы, т.е. возможность синтеза протяженных фрагментов ДНК. Без «хомута» фермент может присоединить к растущему концу цепи всего несколько десятков звеньев. «Скользящий хомут» связывается с ДНК, причем внутренний диаметр этого мультимерного торроида соответствует диаметру двойной спирали ДНК (с учетом слоя гидратированной воды между ними). Далее «хомут» связывается с ДНК-полимеразой (располагаясь за ней по ходу репликации) и образует нековалентные белок-белковые контакты, которые специфичнее и прочнее, чем ДНК-белковые контакты самой ДНК-полимеразы с ДНК. В комплексе с «хомутом» ДНК-полимераза прочнее связывается с ДНК, что увеличивает

не только протяженность «пробега» этого фермента по ДНК, но и эффективность его работы.

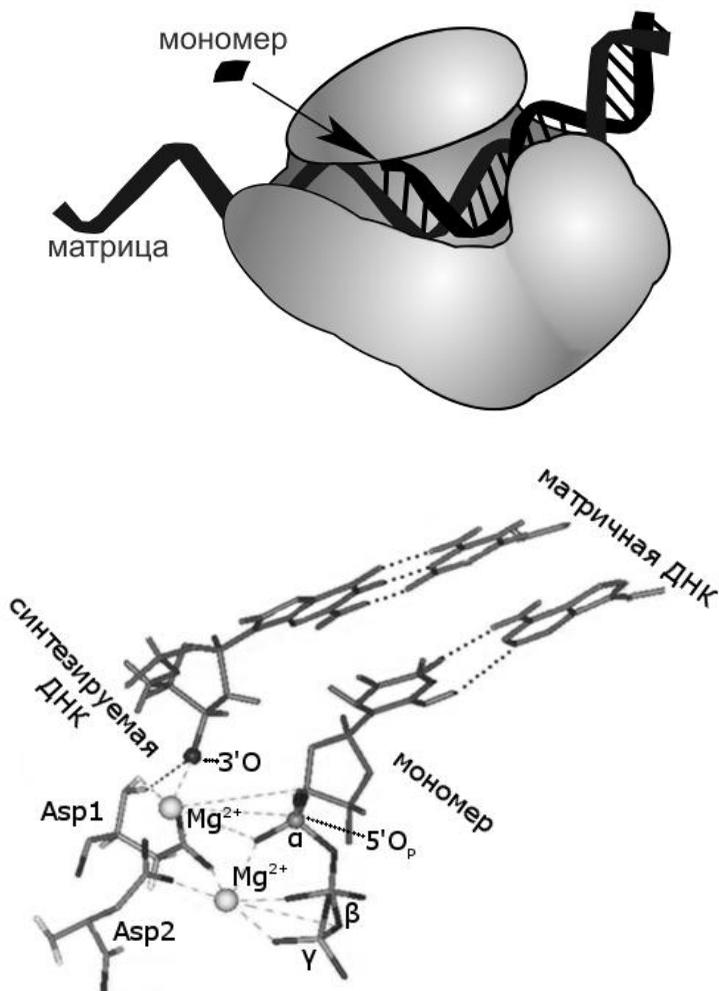


Рисунок 6.3. Схематическое изображение ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, катализирующей матричный синтез ДНК (вверху). Каталитический центр фермента в фермент-субстратном комплексе (внизу).

Соблазнительно предположить, что такой «хомут» принимает участие в «контроле качества» вновь синтезируемого дуплекса ДНК. Если в реакцию вступит некомплементарный трифосфат, то ориентация добавленного нуклеотида и его концевой гидроксила будет неправильной, что нарушит взаимодействие «хомута» с искаженной двойной спиралью ДНК. То есть, «хомут» может выполнять функцию «кольца - калибра», который, в случае несоответствия структуры вновь синтезируемой ДНК стандартным параметрам двойной спирали, не сможет перемещаться, репликация замедлится/остановится, и в дело вступят корректирующие ферменты, которые гидролизуют фосфодиэфирную связь с некомплементарным звеном.

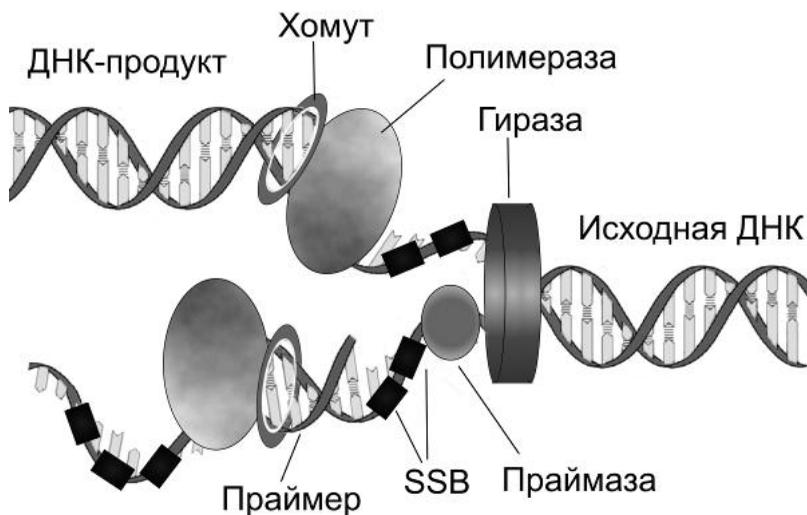


Рисунок 6.4. Реплисома – макромолекулярный комплекс, осуществляющий репликацию.

Транскрипция ДНК - биосинтез РНК

Рассматривая устройство и работу системы генетической информации клетки продолжим аналогию с компьютером. Компьютерные файлы имеют свои имена, чтобы найти и востребовать их из памяти жесткого диска. То же самое происходит и с отдельными генами-файлами: необходимо иметь имена генов-файлов и виде мотивов в первичной структуре ДНК, чтобы найти и востребовать нужные гены в геномной ДНК.

Процесс переписывания информации с генов ДНК в молекулы РНК получил название *транскрипции* (англ. *transcription* – переписывание). Переписывание последовательности нуклеотидов происходит с определенного участка и только с одной матричной цепи ДНК; назовем ее *антисмысловой* цепью.

На матричной антисмысловой цепи ДНК синтезируется комплементарный полинуклеотид РНК. Поскольку исходные цепи ДНК комплементарны, то последовательность нуклеотидов в транскрипте РНК будет идентична второй цепи ДНК, которая комплементарна матричной цепи. Назовем эту вторую цепь *смысловой* цепью.

В литературе при описании транскрипции используются различные названия для двух цепей ДНК. Некоторые из названий, например, «кодирующая цепь» (вместо смысловой) может ввести в заблуждение, поскольку кодирующая цепь ДНК не принимает участия в транскрипции, транскрибируется антисмысловая цепь двуяжевой ДНК. В связи с чем употребление терминов «смысловой» и «антисмысловой» представляется более мотивированным; кроме того, это сохраняет смысл терминологии в других явлениях, которые рассматриваются в этом курсе.

Чем РНК отличается от ДНК

РНК, также, как и ДНК, - это полинуклеотид; т.е. макромолекула, повторяющимся звеном которой является нуклеотид, а звенья соединяются фосфодиэфирной связью.

Первое отличие РНК от ДНК – это структура сахара. На это указывает уже само название - рибоза отличается от дезоксирибозы наличием гидроксильной группы: у РНК в 2'-положении рибозы есть гидроксильная группа. У ДНК обе гидроксильные группы (5' и 3') задействованы в образовании 5'-3' фосфодиэфирной связи; дополнительная свободная 2'-гидроксильная группа придает полинуклеотидной цепи РНК уникальные свойства, как химические, так и структурно-функциональные.

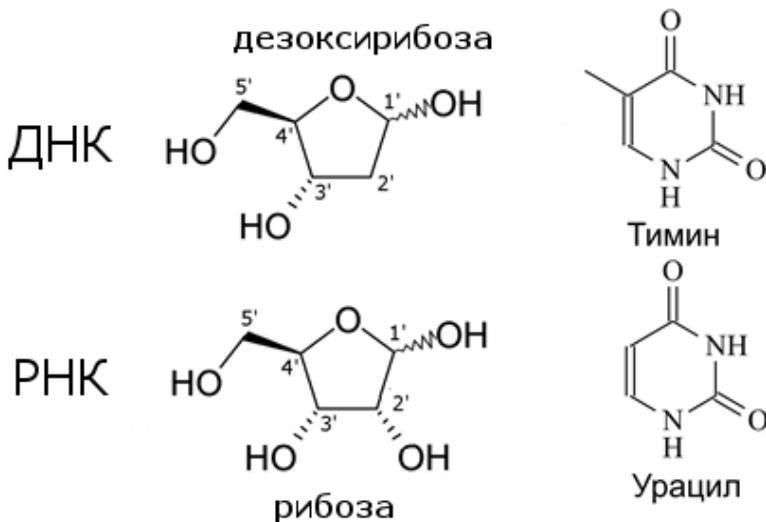


Рисунок 6.5. Различия ДНК и РНК в химической структуре.

Второе отличие РНК от ДНК – это отсутствие модификации химической структуры одного гетероциклического основания – тимина. Если у тимина (Т) убрать метильную группу в 5 положении гетероциклического основания, то получится урацил (U). У тимина метильная группа находится не на той стороне гетероциклического основания, которая участвует в образовании Уотсон-Криковских пар; поэтому в структуре двойной спирали ДНК эта метильная группа расположена во внешнем желобке спирали. Если с этим желобком ДНК будет взаимодействовать белок (см. далее), то наличие/отсутствие метильной группы может играть существенную роль в образовании комплекса. Тем самым, несмотря на малый размер и отсутствие функциональных заместителей, метильная группа может быть критичным фактором для того, чтобы отличить дуплексы ДНК, от, например, гибридных дуплексов ДНК/РНК, играя роль своеобразной «метки» ДНК.

Очевидно, что оба эти отличия РНК от ДНК не затрагивают структуры функциональных групп, которые участвуют в образовании нековалентных комплементарных пар в двойной спирали, а также в образовании ковалентной фосфодиэфирной связи, поэтому в основе процессов биосинтеза РНК на матрице ДНК (транскрипция) и биосинтеза ДНК на матрице ДНК (репликация) лежат одни и те же молекулярные механизмы.

Основные отличия транскрипции и репликации ДНК связаны со структурой сигналов на ДНК, определяющих, какой участок будет транскрибироваться. Как и любой процесс, транскрипция разбивается на три этапа: инициация, элонгация и терминация. Поэтому начало и конец «генетического файла» для транскрипции задаются сигналами инициации и терминации. Как уже отмечалось, механизм образования фосфодиэфирной связи, элонгация, для полинуклеотидов ДНК и РНК один и тот же. Матричный

синтез РНК на ДНК из мономеров, рибонуклеозидтрифосфатов (rNTP), катализирует фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза, или просто РНК-полимераза; термин «ДНК-зависимая» просто подчеркивает матричный характер синтеза.

Инициация транскрипции

Мотивы первичной структуры ДНК, которые определяют начало транскрипции, называются *промоторами* (англ. *promoter* – то, что способствует); промотор можно сравнить с названием компьютерного файла. На ДНК промоторы «узнаются» определенными белками, которые специфически взаимодействуют только с промотором.

Для обсуждения мотивов в первичной структуре ДНК введем систему линейных координат. Заметим сразу, что, хотя нумерация обозначается только на одной цепи ДНК, она относится к двутяжевому участку целиком. На смысловой цепи (которая не транскрибируется, структура которой совпадает с РНК) обозначим первый нуклеотид ДНК, который совпадает с первым нуклеотидом РНК, как *стартовый* нуклеотид и присвоим ему координату (+1), тогда все последующие нуклеотиды будут нумероваться как (+2), (+3) и т.д., аналогичные номера будут у нуклеотидов в синтезируемой РНК, т.н. *первичном транскрипте*. Нуклеотиды, которые расположены на этой же цепи ДНК слева от стартового (+1), нумеруются со знаком минус, как (-1), (-2) и т.д., этот район двутяжевой ДНК не транскрибируется.

В простейшем случае промотор состоит из двух «слов», расположенных на определенном расстоянии от старта транскрипции и, конечно, на определенном расстоянии друг от друга; можно назвать их «именем и фамилией» генетического файла. Только в отличие от имен и фамилий, размеры трех промежутков между стартом тран-

скрипции, двумя мотивами и между ними, тоже являются значимым параметром. Следовательно, промотор можно характеризовать по 5 параметрам.

Рассмотрим пример. Единственная хромосомная ДНК даже небольшой бактерии имеет более миллиона пар нуклеотидов. Какими должны быть параметры, чтобы промотор был индивидуальным? Если один мотив состоит из шести букв, то частота его встречаемости будет $1/4^6$ или $1/4096$. Если размеры второго мотива тоже шесть букв, то частота встречаемости тандема равняется приведению частот, т.е. $1/16 \cdot 1/4096$, что с запасом обеспечивает уникальность промотора. Каждый мотив представлен паттерном с консенсусной последовательностью нуклеотидов, которая умеренно консервативна среди разных промоторов на хромосомной ДНК. Такое устройство обеспечивает не только уникальность промотора среди других последовательностей нуклеотидов в хромосомной ДНК, но и индивидуальность каждого промотора среди всего множества промоторов. Два мотива разделены примерно 20 парами нуклеотидов, т.е. двумя витками спирали, что позволяет обоим мотивам находиться на одной стороне цилиндра двутяжевой ДНК. Расстояние между мотивами и от старта транскрипции умеренно консервативно, а небольшие вариации также способствуют проявлению индивидуальности каждого промотора.

В клетках бактерий вся ДНК транскрибируется только одним ферментом, единственной ДНК-зависимой РНК-полимеразой. То, что у всех промоторов имеется общая консенсусная структура, позволяет одному и тому же белку узнавать разные промоторы. Индивидуальные отличия промоторов определяют разницу в эффективности связывания РНК-полимеразы, а, следовательно, и разницу в уровне транскрипции гена, который находится под контролем данного промотора.

	-35	-10	+1
<i>araBAD</i>	CCTACCTGACGCTTTT	TATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA	
<i>araC</i>	TGATTATAGACACTTTT	TGTACGCGTTTTTGTGATGGCTTTGGT	
<i>biaA</i>	AAAACGTGTTTTTT	TGTGTTAATTCGGGTAGACTTGTAACCT	
<i>biaB</i>	ATCGACTTGTA AACCAAAT	TGAAAAGATTTAGGTTTACAAGTCT	
<i>galP2</i>	ATTCCATGTCACACTTTT	TCGCATCTTTGTTATGCTATGGTTATT	
<i>lac</i>	CAGGCTTTACACTTTAT	GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT	
<i>lacI</i>	CGAATGGCGCAAAAGCTTT	TCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGG	
<i>rmAI</i>	TAAATGCTTGACTCTGT	AGCGGGAAGCGCTATTATCACACCCCC	
<i>rmDI</i>	AAAATACTTGTGCAAAAAAT	TGGGATCCCTATAATGCGCCTCCG	
<i>tRNA^{Tyr}</i>	TTTTCTATTGCGGCGT	GCGGAGA ACTCCCTATAATGCGCCTCCA	
<i>trp</i>	GAGCTGTTGACAATTAAT	CATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAA	

консенсус TCTTGACAT [11-15пар] TATAAT [5-8пар] старт

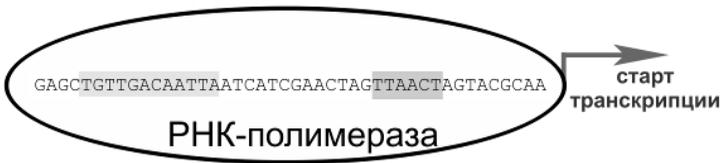


Рисунок 6.6. Промоторы разных бактериальных генов и пример консенсусной последовательности.

В районе (-10) имеется мотив ТАТААТ, расположенный на расстоянии 5-9 нуклеотидов слева от старта. Вероятность нахождения для каждого нуклеотида в 6-членной последовательности, выраженная в процентах, следующая: 79-95-44-59-51-96, соответственно; другими словами, почти все промоторы имеют Т во втором и шестом положениях. В районе (-35) имеется еще один 6-членный мотив ТТGАСА, расположенный на расстоянии 16-19 нуклеотидов левее первого мотива с частотой встречаемости нуклеотидов 82-84-79-64-53-45, соответственно. Консенсусная последовательность для старта транскрипции мало консервативна, чаще всего первым нуклеотидом (+1) является пурин, например, в триаде САТ со стартовым нуклеотидом А.

Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза состоит из пяти полипептидов/субъединиц, суммарная масса которых

около 400 кДа. На двух последовательных этапах транскрипции, инициации и элонгации, РНК-полимераза должна обеспечивать прямо противоположные функции. На стадии инициации транскрипции взаимодействие РНК-полимеразы с двутяжевым промоторным участком ДНК происходит специфично и эффективно. А потом - наоборот, при матричном копировании РНК-полимераза связывается с любым участком ДНК и гораздо слабее, чтобы обеспечить передвижение по матрице.

За особое поведение РНК-полимеразы на промоторе отвечает специальный белок, т.н. сигма-фактор. Комплекс сигма-фактора с РНК-полимеразой взаимодействует с мотивом (-35) промотора, что вызывает частичную деспирализацию соседних множественных пар А-Т мотива (-10) и участка старта, формируя т.н. открытый промоторный комплекс, другими словами «*транскрипционный глаз*», у которого деспирализовано около 13 пар нуклеотидов ДНК (ср. с процессом образования «репликационного глаза»).

Элонгация транскрипции

Итак, на участке начала транскрипции происходит частичная деспирализация ДНК, на одנותяжевом участке антисмысловой матричной цепи происходит взаимодействие с первым рибонуклеозидтрифосфатом и образуется первая комплементарная пара. Трифосфат второй комплементарной пары ориентируется в пространстве таким образом, чтобы обеспечить атаку 3'-гидроксилем первого мономера α -фосфатную группу второго мономера с образованием стандартной фосфодиэфирной связи и уходом пиррофосфата как второго продукта реакции.

Следует подчеркнуть, что РНК-полимераза способна начинать транскрипцию с образованием связи между первыми мономерами, в отличие от ДНК-полимеразы, которая не способна это делать и требует наличия предсуществующего короткого дуплекса для реакции с первым мономером.

По мере дальнейшей деспирализации ДНК происходит пошаговое, ступенчатое присоединение мономеров - трифосфатов с образованием гибридного дуплекса РНК-ДНК, причем растущим является 3'-конец РНК. При элонгации средство сигма-фактора к РНК-полимеразе ослабевает и фактор диссоциирует из комплекса.

В целом, механизмы реакции между мономерами при биосинтезе РНК и ДНК очень похожи. Отметим только одну дополнительную особенность: поскольку rNTP и РНК имеют 2'-гидроксил, отсутствующий у ДНК, РНК-полимераза должна обеспечить точную пространственную ориентацию мономеров, чтобы реакция проходила строго по 3'-гидроксильной группе, а не по соседней 2'-гидроксильной группе.

По мере элонгации транскрипции, 5'-концевой участок РНК диссоциирует из гетеродуплекса, выходит из транскрипционной вилки, а цепи ДНК вновь ренатурируют.

Как только район промотора восстанавливается вновь в виде двутяжевой ДНК, с ним взаимодействует следующая РНК-полимераза, поэтому единичный ген транскрибируется не одной РНК-полимеразой, а целым караваном РНК-полимераз, которые следуют одна за другой. В электронном микроскопе можно видеть распределение серии транскриптов РНК по гену, когда по мере удаления РНК-полимеразы от промотора транскрипты удлиняются, а об-

щий рисунок активной транскрипции гена имеет форму елочки.

Терминация транскрипции

Мотивы в первичной структуре ДНК, которые определяют завершение транскрипции, называются *терминаторами*. На терминаторе РНК-полимераза останавливается и полностью диссоциирует из комплекса с ДНК, *первичный транскрипт* РНК (точная копия гена) также диссоциирует, а ДНК восстанавливает двуцепочечную структуру. В зависимости от типа гена существуют разные типы терминаторов.

Так, например, один из типов терминаторов представляет собой т.н. *инвертированный повтор*: последовательность участка ДНК длиной 10 пар нуклеотидов после 5 пар нуклеотидов переходит в комплементарную последовательность; через несколько пар нуклеотидов повтор завершается протяженным блоком пар АТ:

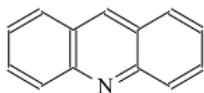
```
CCGGTAGGCGNNNNNCGCCTACCGGNNTTTTTTTTTTTT  
GGCCATCCGCNNNNNGCGGATGGCCNNAAAAAAAAAA
```

Транскрипция такого участка ДНК приведет к синтезу РНК, два 10-мерных комплементарных участка которой сложатся пополам и образуют «шпильку», в основании которой будет протяженный блок из остатков U. Двухцепочечный участок богат парами G-C, шпилька РНК будет более стабильной, чем гетеродуплекс РНК с ДНК, что уменьшит количество контактов гетеродуплекса с РНК-полимеразой и вызовет ее остановку. Наличие большого количества легкоплавких пар rU-dA в гетеродуплексе соседнего района вызовет диссоциацию продукта – транскрипта РНК.

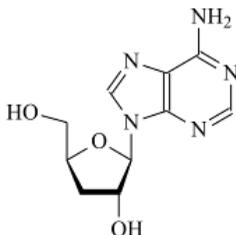
Ингибиторы транскрипции

Ингибировать транскрипцию можно либо блокируя матрицу ДНК, либо блокируя фермент, либо используя модифицированный субстрат - мономер.

Как блокировать матрицу – т.е. двутяжевую ДНК? Не разрешить раскручивание двойной спирали ДНК. Так, например, интеркалирующие красители, такие как актиномицин или акридин, связываются с двойной спиралью ДНК, ароматическая система красителя внедряется между парами оснований, а пептидные заместители красителя взаимодействуют с фосфатами снаружи, тем самым деспирализация крайне затрудняется, что блокирует транскрипцию.



Акридин



Кордицепин

Рисунок 6.7. Ингибиторы транскрипции акридин и кордицепин.

Во-вторых, РНК-полимеразу можно ингибировать, как любой другой фермент. У бактерий такой ингибитор будет антибиотиком. И действительно, антибиотик рифампицин сыграл большую роль в лечении туберкулеза, подавляя микобактерии. У эукариот такой ингибитор будет ядом. В бледной поганке содержится α -аманитин, циклический пептид из восьми аминокислот, полуметальная доза которого составляет $LD_{50} = 0,1$ мг/кг. Яд взаимодействует с

зоной активного центра фермента и практически блокирует перемещение РНК-полимеразы по ДНК.

В-третьих, нуклеотидные производные по сахару, которые затрагивают 3'-гидроксил, но сохраняют субстратное связывание с ферментом, будут также ингибировать транскрипцию. Интересным примером такого ингибитора является кордицепин, 3'-дезоксиаденозин, у которого в 3'-положении гидроксила нет. Он интенсивно изучается современными методами, поскольку первоначально был открыт как средство из традиционной восточной медицины.

Глава 7

Структура и функция РНК. Биосинтез белка

В предыдущей главе мы рассмотрели процесс транскрипции, в котором с транскрибируемого гена снимается полная копия одного тяжа ДНК в виде молекулы РНК, т.н. *первичного транскрипта*. Дальнейшая судьба всех первичных транскриптов зависит от того, к какому типу РНК они относятся. Первичный транскрипт претерпевает пост-транскрипционные изменения, в основе которых лежат многочисленные реакции с участием фосфодиэфирной связи - расщепление и лигирование РНК, иногда с перегруппировкой структуры, например, *сплайсинг*. Кроме того, происходят реакции пост-транскрипционной модификации по гетероциклическим основаниям и сахару.

Все РНК можно разбить на два типа: прежде всего, многие РНК кодируют белки, на этих РНК происходит биосинтез белка, поэтому они называются *матричными РНК* (мРНК); остальные РНК называются *некодирующими РНК* (нкРНК). Среди нкРНК больше всего в клетке *рибосомных РНК* (рРНК) и *транспортных РНК* (тРНК), а также очень разнообразное семейство т.н. больших и малых нкРНК.

В последнее время нкРНК интенсивно изучаются в связи с их предполагаемым участием в построении дополнительной регуляторной сети не только для экспрессии генов, но и для иммунитета и защиты клетки от чужеродной генетической информации, включая вирусы.

Химическая структура РНК рассмотрена в предыдущей главе. Дополним ее несколькими замечаниями. Наличие 2'-гидроксила по соседству с 3'-фосфодиэфирной связью определяет гидролитическую нестабильность РНК –

возможна внутримолекулярная атака 2'-гидроксилом ФДЭ и ее разрыв: образуется циклический эфир фосфорной кислоты на 3'-конце первого фрагмента РНК, 5'-гидроксильная уходящая группа остается на конце второго фрагмента РНК.

Однако наличие дополнительной 2'-гидроксильной группы сахара – это не только недостаток, но и существенное преимущество для структуры РНК: она способна быть донором и акцептором водородной связи, что существенно для трехмерной укладки однотяжевой РНК.

Первичная структура РНК

Также, как и в случае ДНК, первичной структурой РНК называется последовательность нуклеотидов; вновь подчеркнем, что это термин имеет информационное содержание. Методы определения первичной структуры РНК достаточно специфичны. Чаще всего первичную структуру РНК определяют по ее ДНК-копии методами секвенирования ДНК.

Вторичная структура РНК

Самое большое различие РНК и ДНК - это однотяжевая структура РНК (иногда используют термин «одноцепочечная»). В растворе полинуклеотидный тяж РНК образует структуру, которую назвали *шпилька* (анг. *hairpin* – шпилька для волос), иногда ее называют *стебель-с-петлей* (анг. *stem-loop*).

Сравните структуру шпильки РНК с бета-шпилькой для вторичной структуры белка.

Рассмотрим образование шпильки РНК на конкретном примере. Допустим на определенном участке РНК есть следующая последовательность нуклеотидов:

ACGUGUCCUCACGU - пять нуклеотидов, которые подчеркнуты, комплементарны последующему ближайшему участку, который тоже подчеркнут. Они комплементарны и поэтому формируют двойную спираль, тяжи которой антипараллельны и соединяются петлей из четырех нуклеотидов, которые были между ними. В результате получается структура типа шпильки или «стебель-с-петлей». Короткие взаимно комплементарные участки довольно часто встречаются в первичной структуре РНК, поэтому в формировании вторичной шпилечной структуры РНК вовлечены, как правило, больше половины нуклеотидов.

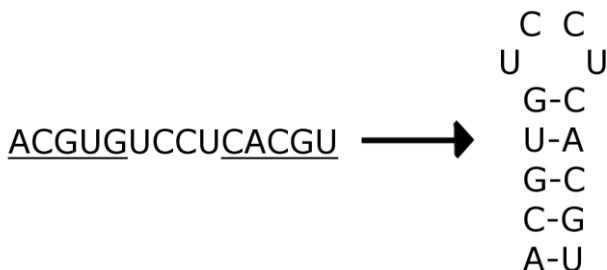


Рисунок 7.1. Схема образования «шпильки» из самокомплементарной РНК

Третичная структура РНК

Под третичной структурой, как и в случае белка, будем понимать положение всех ее атомов в пространстве, т.е. конкретную конформацию РНК.

Одним из начальных этапов самоорганизации соседних шпилек в РНК можно считать *коаксиальный стэкинг*. За счет гидрофобного эффекта торцы в основании двух соседних шпилек накладываются друг на друга и ориентируются вдоль одной оси ставшей общей спирали, что формирует единую систему стэкинг-взаимодействий комплементарных пар торцев-в-торец. Образуется протяженная

двойная спираль с петлями на концах, каждая петля экранирует от воды свою ближайшую торцевую комплементарную пару в шпильке.

Еще один очевидный способ структурирования РНК – комплементарные взаимодействия удаленных однотяжевых участков РНК.

Простейшим примером структуры такого типа является псевдоузел.

Свободная 2'-гидроксильная группа рибозы участвует в образовании водородных связей в третичной структуре РНК. Это придает РНК дополнительные возможности в организации сложной конформации.

Также, как и для белка, пространственная структура РНК имеет сложную поверхность со специфическим распределением рельефа и зарядов, что позволяет РНК выполнять многочисленные функции путем специфического взаимодействия с различными лигандами, РНК может «узнавать» молекулы или макромолекулы (или узнаваться ими). Это могут быть постоянные партнеры в стабильных комплексах (например, белки в РНК-содержащих вирусах), или временные партнеры (например, в динамических интерактах).

Более того, благодаря сложной третичной структуре РНК формирует сложную поверхность и способна осуществлять катализ, т.е. быть *рибозимом* (от рибонуклеиновая кислота + энзим). Правда, существенно меньшее, чем у белка, разнообразие боковых радикалов (4 вместо 20) значительно снижает качественный и количественный потенциал рибозимов по сравнению с белковыми ферментами (энзимами).

Пространственная структура тРНК

Рассмотрим формирование вторичной и третичной структуры на примере небольшой молекулы РНК – транспортной РНК (тРНК). Молекулы тРНК имеют небольшую длину, в среднем около 80 нуклеотидов.

Вторичная структура тРНК представлена четырьмя шпильками, изображение которых на плоскости напоминает *клеверный лист* – стебель и три шпильки; каждая шпилька имеет свое название. Двухжелевой участок, соединяющий комплементарные концы молекулы, называется *акцепторным стеблем*, поскольку «акцептирует» аминокислоту. Далее, по часовой стрелке идет Т-шпилька, *антикодонавая шпилька* и D-шпилька (Рисунок 7.2); антикодонавая шпилька названа по выполняемой функции – антикодонавый триплет взаимодействует с триплетом-кодоном мРНК (см. следующий раздел «Биосинтез белка»), остальные две шпильки названы по наличию модифицированных гетероциклических оснований, их петли содержат: в Т-шпильке тимин вместо урацила, что необычно для РНК, и в D-шпильке 5,6-дигидроуридин (модифицированное основание).

Формирование третичной структуры тРНК служит прекрасной иллюстрацией изложенных ранее общих принципов. Торцевой коаксиальный стэкинг соседних шпилек приводит к попарному взаимодействию акцепторного стебля с Т-шпилькой и антикодонавой шпильки с D-шпилькой, формируя на промежуточном этапе сворачивания (*фолдинга*) тРНК два спиральных домена молекулы. Два спиральных домена поворачиваются в пространстве относительно центральной части молекулы таким образом, чтобы Т- и D-петли сблизилась; так формируется угол молекулы, который стабилизируется водородными связями между нуклеотидами Т- и D-петель. Таким образом, третичная структура тРНК представляет собой Г-образную

молекулу с двумя спиральными доменам, она довольно жестко фиксирует в пространстве два функциональных участка тРНК: антикодоновую петлю и 3'-конец акцепторного стебля (см. следующий раздел «Биосинтез белка»). Структура всех, за малым исключением, тРНК эволюционно консервативна.

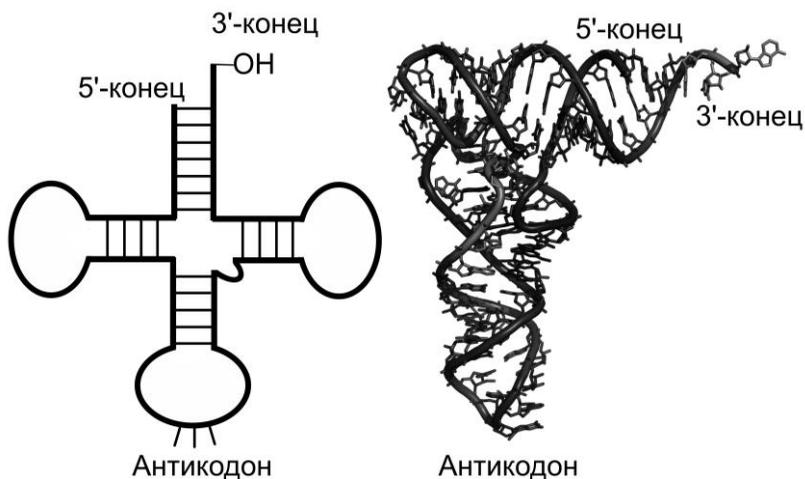


Рисунок 7.2. Вторичная (слева) и третичная (справа) структура тРНК.

Биосинтез белка

Биосинтез белка часто называют процессом, который связывает два основных понятия для клетки: генотип и фенотип. За генотип отвечают нуклеиновые кислоты (НК), а за фенотип, т. е. функционирование, в основном, белки. Поскольку НК и белки - это два абсолютно разных химических типа макромолекул, то очевидно возникает вопрос - как между ними установить соответствие? Эту задачу нельзя решить просто матричным копированием, как это было сделано для процессов, связанных только с ДНК и

РНК. Для репликации и транскрипции как матрица, так и вновь синтезируемая молекула принадлежали к одному классу и их взаимно однозначное соответствие определяли простые правила комплементарности: А – Т и G – С.

Биосинтез белка называется *трансляцией*, поскольку именно в этом процессе решается задача перевода последовательности 4 нуклеотидов мРНК в последовательность 20 аминокислот белка. Принципиально разная химическая структура повторяющихся звеньев, несоответствие их количественного разнообразия (4 против 20) делают невозможным использование простого матричного принципа «один-в-один», который так элегантно и просто был реализован при копировании нуклеиновых кислот.

Какие единицы информации будут считываться одна за другой с молекулы мРНК, чтобы ставить им в соответствие одну за другой необходимые аминокислоты и вовлекать их в матричный ступенчатый биосинтез полипептидной цепи? Другими словами, необходимо установить правила кодирования, как например сделано это в азбуке Морзе, когда сочетание всего лишь двух знаков, точек и тире, кодирует больше 20 букв алфавита и цифр.

Генетический код

Разнородная качественная и количественная природа информационных единиц ДНК/РНК и белка позволяет переформулировать поставленную проблему следующим образом. Как текст, записанный 4 нуклеотидами в мРНК, перевести, т.е. транслировать в текст, записанный 20 аминокислотами в белке? Какова структура и свойства *генетического кода*?

Очевидно, что при прямом кодировании 1:1 4 нуклеотида могут кодировать только 4 аминокислоты. Если взять динуклеотид, N_1N_2 , то двоек будет равно числу сочетаний из 4 нуклеотидов по 2, т.е. $4^2 = 16$, что тоже несколько

меньше числа аминокислот. Поэтому минимальной кодирующей единицей должен быть тринуклеотид, $N_1N_2N_3$, таких троек будет равно числу сочетаний из 4 нуклеотидов по 3, т.е. $4^3 = 64$, что намного больше числа аминокислот. Тройка нуклеотидов мРНК, которая кодирует одну аминокислоту, называется *триплетом* или *кодоном*. Существуют несколько способов графической организации кодовой таблицы, мы воспользуемся циркулярным, как наиболее наглядным (Рис. 7.3).

Сначала кратко перечислим основные свойства кода, а потом рассмотрим их на конкретных примерах.



Рисунок 7.3. Генетический код: соответствие триплета нуклеотидов одной аминокислоте. Триплет нуклеотидов читается из центра к краю; далее приведено однобуквенное и трехбуквенное обозначения кодируемой аминокислоты.

Генетический код *вырожден*, т.е. одна аминокислота может кодироваться несколькими триплетами/кодонами. Иногда генетический код называют псевдодуплетным, по-

сколькx очень часто в наборе кодонов (2 или 4) для данной аминокислоты две первые буквы одинаковы, а меняется только третья буква кодона. Причем, если она любая, то для данной аминокислоты будет четыре кодона; если она - любой пурин или любой пиримидин, то для данной аминокислоты будет два кодона. Избыточность / вырожденность генетического кода придает коду высокую степень помехоустойчивости. Это означает, что точечные мутации могут не приводить к замене аминокислоты, если они происходят по 3-му положению.

Триплеты генетического кода *не перекрываются* (см. далее). Если бы триплеты перекрывались, т.е. читались бы со сдвигом, например, в 1 нуклеотид, то точечная мутация в ДНК, а, следовательно, и в мРНК, изменяла бы не одну аминокислоту, а как минимум две, что приводило бы к двойной мутации в кодируемом белке, что крайне нецелесообразно.

Кодоны «читаются» *последовательно, один за другим, без пропусков и знаков препинания*, как непрерывный текст. Последовательность триплетов от стартового кодона до стоп-кодона (см. далее) называется *открытой рамкой считывания*.

И, наконец, генетический код *универсален*: все живые системы используют одну и ту же кодовую таблицу, будь то бактерии или клетки высших организмов, включая человека. Редкие исключения (например, у митохондрий) имеют эволюционную природу, что еще раз подтверждает универсальность кода. Универсальность кода показывает, что его структура установилась на самых первых этапах возникновения системы живого, в клетках прогеноты, и в дальнейшем глобально не эволюционировала.

Именно универсальность генетического кода позволяет искусственно манипулировать генетической информацией, перекраивая ее и перемещая между организмами с

помощью методов генетической инженерии, что во многом определяет успехи современной биотехнологии и медицины.

Рассмотрим некоторые конкретные примеры генетического кода.

Стартовый кодон. Единственный кодон AUG кодирует аминокислоту метионин (М, Met). AUG называется стартовым кодоном, потому что с него начинается открытая рамка считывания практически всех белков, все вновь синтезированные белки начинаются с метионина.

Стоп-кодона. Три кодона не кодируют аминокислот: UAA, UAG, UGA. Они называются стоп-кодонами и на них заканчивается открытая рамка считывания всех белков.

Существует семейство кодонов, которые для одной аминокислоты имеют четыре кодона, которые отличаются друг от друга по третьему положению: например, пролин (P, Pro) кодируется любым из четырех триплетов CCN, где N –либо из четырех нуклеотидов, т.е. CCU, CCC, CCA, CCG. К этому семейству аминокислот относится довольно много аминокислот: лейцин (L, Leu), валин (V, Val), серин (S, Ser), треонин (T, Thr), аланин (A, Ala), аргинин (R, Arg), глицин (G, Gly).

Другой тип вырожденности кода - это парные семейства с вариациями третьей буквы: либо для пиримидинов (Py), либо для пуринов (Pu). Например, аспарагин (N, Asn) кодируется двумя триплетами AАРy (AAU и AAC); а лизин (K, Lys) - двумя триплетами ААРu: AAA и AAG. К этому же семейству аминокислот относятся другие пары: фенилаланин (F, Phe) - UUPy и лейцин (L, Leu) –UUPu; тирозин (Y, Tyr) - UAPy и стоп-кодона –UAPu; гистидин (H, His) - CAPy и глутамин (Gln) –CAPu; аспарагиновая кислота (D, Asp) - GAPy и глутаминовая кислота (E, Glu) –GAPu; серин (S, Ser) - AGPy и аргинин (R, Arg) –AGPu.

Есть аминокислоты-рекордсмены, например, лейцин (L, Leu) кодируется шестью кодонами. Четыре кодона семейства CUN и у парного пуринового семейства кодонов изменена первая буква на U - UUPu: UUA и UUG. Аргинин (R, Arg) кодируется тоже шестью кодонами – семейство CGN и у парного пуринового семейства кодонов изменена первая буква на A - AGPu: AGA и AGG.

Можно предположить, что псевдодуплетный характер генетического кода является следствием эволюционных процессов.

Функциональная структура тРНК

Кодовая таблица ничего не говорит о том, как устанавливается взаимно-однозначное соответствие между данным триплетом мРНК и аминокислотой, т.е. как происходит декодирование. Трудно представить себе, что существует простое и однозначное структурное соответствие между тройкой нуклеотидов и аминокислотой, которое бы использовалось при ступенчатом матричном биосинтезе белка; а если учесть, что код вырожденный, то такое специфическое соответствие скорее всего просто невозможно. Напомним, что при ступенчатом матричном биосинтезе нуклеиновых кислот соответствие между матрицей и мономерах устанавливалось с помощью комплементарных пар.

Задача по декодированию сначала была решена теоретически Ф. Криком в 1957 г., а затем в том же году - экспериментально. Тот факт, что молекула и ее функция сначала были предсказаны теоретически, а потом уже она была обнаружена экспериментально – это редкий случай в химической биологии. Адапторная гипотеза предполагала, что для декодирования должна существовать специальная декодирующая молекула-посредник (молекула-адаптор) с двумя функциональными центрами. Один центр должен

«узнавать/считывать» кодон на мРНК, а второй – «нести» соответствующую активированную аминокислоту, способную реагировать с растущим пептидом.

Проще всего предположить, что первый функциональный центр декодирующей молекулы «считывает» триплет на мРНК по уже знакомым правилам комплементарности для нуклеиновых кислот. Но это значит, что такой молекулой должны быть РНК с комплементарным триплетом, который можно назвать *антикодоном*. Самый простой вариант структуры такой РНК – это короткая шпилька с петлей, в которой расположен антикодон.

Ко второму функциональному центру декодирующей РНК должна быть ковалентно присоединена аминокислота. Причем связь должна быть такой, чтобы активировать карбоксильную группу первой аминокислоты и обеспечить атаку аминогруппой второй аминокислоты с образованием пептидной связи. Проще всего активировать карбоксильную группу первой аминокислоты через сложный эфир. В качестве спиртового остатка для такого эфира может выступать 3'-концевая гидроксильная группа молекулы РНК-адаптора. Такой эфир аминокислоты можно получить путем ацилирования, точнее аминоацилирования, 3'-концевого гидроксила РНК-адаптора. Таким образом, молекула декодирующей РНК-адаптора должна иметь в своей структуре триплет антикодона, комплементарный триплету кодону мРНК и расположенный в односторонней петле, а ее 3'-концевой гидроксил должен быть аминоацилирован соответствующей аминокислотой. Декодирующая РНК-адаптор была названа транспортной РНК (тРНК), поскольку она транспортирует аминокислоту для биосинтеза белка.

Именно пространственную структуру тРНК мы и разобрали в начале этой главы. В данном разделе важно отметить следующее. тРНК - это Г-образная молекула с

двумя взаимно перпендикулярными спиральными доменами, на дистальных (удаленных) концах которой расположены два функциональных участка: антикодон и акцепторный 3'-конец. Рассмотрим их структуру немного подробнее. Антикодоновая петля отличается от остальных петель РНК тем, что ее гетероциклические основания не спрятаны от воды из-за гидрофобного эффекта, а наоборот, вывернуты наружу, в воду, формируя часть полуспирали, которая должна взаимодействовать с мРНК с образованием трех пар короткого дуплекса РНК (три пары из одиннадцати пар полного витка спирали РНК). Акцепторный стебель на 3'-конец у всех тРНК имеет универсальный однотожевой участок ССА_{он}, гидроксильная группа концевого аденозина аминоацилируется аминокислотой, которая соответствует данному антикодону; продукт называется *аминоацил-тРНК* (aa-тРНК). Как выбирается такая АК и как происходит аминоацилирование? Ответы на эти вопросы позволят нам понять, как происходит процесс декодирования, «чтения» генетического кода.

Аминоацилирование тРНК

Что же является «кодазой» – ферментом, который декодирует, т.е. обеспечивает взаимно однозначное соответствие антикодона тРНК и аминокислоты?

Одним из названий фермента было «кодаза», которое образовано как «код+аза». Несмотря на самоочевидность и легкое запоминание этого тривиального названия оно уступило место более номенклатурному - аминоацил-тРНК-синтетаза.

Весь сложный и многоступенчатый процесс декодирования можно разбить на два основных этапа, они существенно различаются как по функции, так и по составу

участников. На первом этапе взаимно однозначное соответствие между антикодоном тРНК и соответствующей ему аминокислотой (как в кодовой таблице) устанавливает фермент – *аминоацил-тРНК-синтетаза (АРСаза)*. На втором этапе aa-тРНК взаимодействует с мРНК и образуется комплементарный кодон-антикодоновый дуплекс РНК-РНК из трех пар оснований. Комплементарность дуплекса необходимо проверить (вспомните проверку дуплекса при репликации ДНК) и стабилизировать его ($T_{пл}$ дуплекса из трех пар оснований ниже комнатной температуры); все это происходит уже на другой структуре, рибосоме, и отвечает за это ее малая субчастица.

Рибосома состоит из двух субчастиц – большой и малой.

Название фермента, с которого начинается декодирование - *аминоацил-тРНК-синтетаза (АРСаза)*, говорит само за себя: фермент проводит аминоацилирование 3'-конца тРНК соответствующей активированной аминокислотой. В данный момент мы пока не знаем деталей структуры и механизма действия АРСазы, которые обеспечивают однозначное узнавание аминокислоты и тРНК.

Полагают, что для каждой аминокислоты существует своя АРСаза, т.е. их должно быть не меньше двадцати. Как выбирается правильная аминокислота и как она активируется? Возможны два сценария выбора аминокислоты. Согласно первому гипотетическому строгому сценарию, в субстратный участок попадает только правильная аминокислота, которая и вступает в реакцию с соответствующей тРНК. Согласно второму сценарию, не строгому, который реализуется в действительности, начальная селекция правильной аминокислоты происходит не очень строго, особенно для близких по структуре АК; например, изолейцин

(Le, I) и валин (Val, V), которые отличаются одной метильной группой. АРСаза ошибается при выборе правильной аминокислоты довольно редко $10^{-4} - 10^{-5}$. Если происходит ошибка в выборе правильной аминокислоты, и она вступает в реакцию, то неправильный продукт будет гидролизован до исходных компонентов, чтобы вернуть систему в исходное состояние и вновь позволить сделать правильный выбор. Такой механизм проверки и возврата в исходное состояние называется *коррекцией* (сравни с репликацией ДНК).

С тем же самым активным центром, что и для связывания аминокислоты, взаимодействует АТФ; между аминокислотой и АТФ происходит реакция ацилирования по альфа-фосфату, в результате которой получается смешанный ангидрид – аминоациладенилат, и пирофосфат (Рис. 7.4).

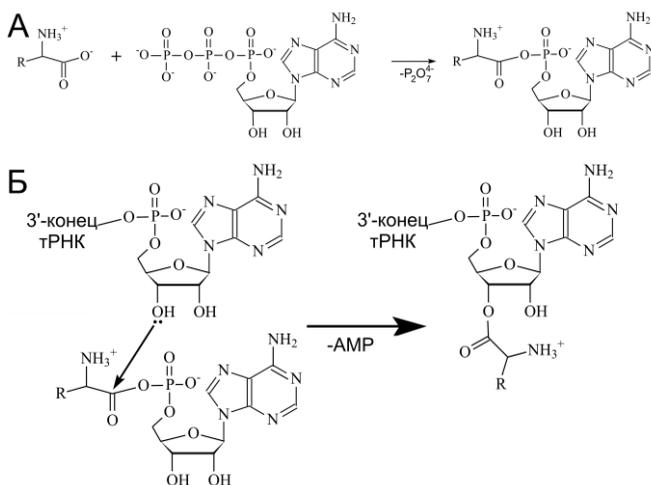


Рисунок 7.4. Активация аминокислоты и ацилирование гидроксила на 3'-конце тРНК.

Узнавание АРСазой своей тРНК – уникальный процесс с индивидуальными правилами, в клетке может быть до пятидесяти разнообразных тРНК. Кинетика узнавания такова: правильная тРНК взаимодействует с АРСазой быстро, образовавшийся комплекс диссоциирует медленно; для неправильной тРНК кинетика полностью противоположная: медленная ассоциация с АРСазой и быстрая диссоциация неправильного комплекса. Частота ошибки в выборе правильной тРНК намного меньше, чем для выбора аминокислоты, и составляет 10^{-6} . Это приводит к тому, что если иногда и происходит активация неправильной аминокислоты, то случаев аминоацилирования тРНК такими неправильными активированными аминокислотами не наблюдается.

Взаимодействие с правильной тРНК приводит к изменению конформации фермента и АРСаза становится активной для аминоацилирования 3'-конца тРНК. На второй стадии происходит реакция аминоациладенилата с 3'-концевым гидроксилом тРНК. По механизму реакции – это алкоголиз смешанного ангидрида, при котором атакуется карбонильный атом углерода аминокислоты, а уходящей группой/молекулой является АМР (Рис. 7.4).

Трансляция - ступенчатый матричный биосинтез полипептида.

Антикодон Аа-тРНК₁ комплементарно взаимодействует с соответствующим кодоном (например, номер 1) мРНК. Следующая Аа-тРНК₂ взаимодействует с соседним кодоном номер 2. На матрице мРНК за счет кодон-антикодоновых взаимодействий позиционируются две молекулы тРНК, к акцепторным концам которых ковалентно присоединены правильные аминокислоты. Исходя из того, что полный виток дуплекса РНК составляет 11 комплементарных пар, то один триплет должен быть повернут относительно дру-

того примерно на $\frac{1}{4}$ оборота. Именно Г-образная третичная структура тРНК обеспечивает возможность сближения в пространстве двух 3'-концов тРНК и присоединенных к ним двух аминокислот.

Вернемся к ранее заданному вопросу – почему в эволюции небольшая шпилька «стебель с петлей» не стала минимальной декодирующей молекулой РНК, имея оба потенциальных функциональных участка – петлей для антикодона и 3'-концевым гидроксилем для аминокислоты? Ответ очевиден – при образовании дуплекса двух шпилек с мРНК концы этих шпилек будут разнесены в пространстве. Природа эволюционно закрепила двухдоменную Г-образную структуру молекулы тРНК, потому что такая структура позволяет сблизить 3'-концы двух молекул.

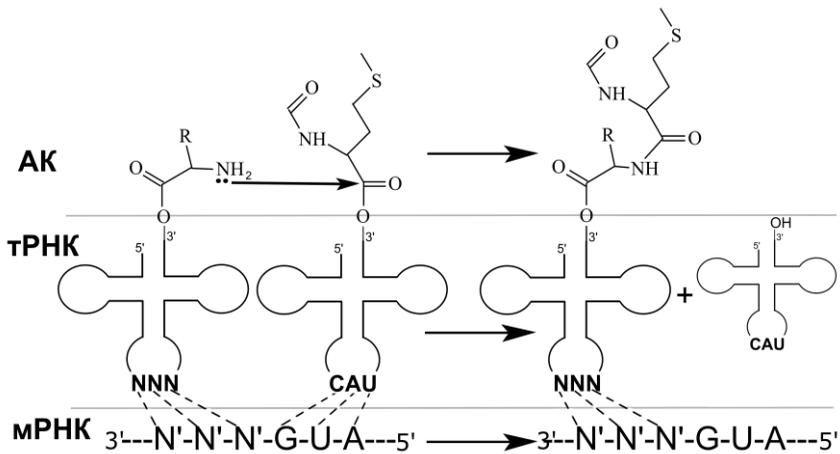


Рисунок 7.5. Реакция образования пептидной связи при биосинтезе белка.

Правильная пространственная ориентация обеспечивает протекание реакции аммонолиза сложноэфирной связи Аа-тРНК₁: неподделенная пара электронов аминогруппы Аа-тРНК₂ атакует атом углерода (с частично положительным зарядом) ацильной группы Аа-тРНК₁ (Рис 7.5).

Очень часто в учебной литературе для того, чтобы проиллюстрировать образование пептидной связи, приводят реакцию между двумя аминокислотами, в которой «отнимается» молекулы воды и образуется дипептид. Даже в качестве схематической иллюстрации такую реакцию приводить категорически нельзя. Аминокислота в растворе существует в виде биполярного цвиттер-иона: депротонированная карбоксильная группа и протонированная альфа-аминогруппа. Простое смешивание двух аминокислот в воде ни к чему не приведет. Для того, чтобы реакция протекала, необходимо активировать аминокислоту, например, ее карбоксильную группу, в виде сложного эфира. Для направленного синтеза очевидна ещё одна проблема: для того, чтобы карбоксильная группа АК₁ реагировала с аминогруппой АК₂, а не с собственной, аминогруппу АК₁ необходимо блокировать. В результате направленной реакции конденсации получается дипептид и высвобождается спирт (Рис. 3.4).

Биосинтез белка на рибосоме, трансляция

Рибосома. Как и в случае матричного синтеза при репликации и транскрипции, матричный синтез при трансляции также осуществляется молекулярной машиной колоссальной сложности – *рибосомой* (сравни с реплисомой). Рибосома - это супрамакромолекулярный комплекс постоянного состава молекул РНК и белков (сравни с реплисомой - динамическим интерактомом). Рибосома должна од-

новременно обеспечивать два абсолютно разных процесса – правильное кодон-антикодоновое взаимодействие тРНК с мРНК и катализ реакции образования пептидной связи. Неудивительно, что каждый из этих процессов обслуживается своей отдельной частью этой сложной наномашинны – *субчастицей* рибосомы; две субчастицы нековалентно взаимодействуют друг с другом.

Термин «субчастица» для рибосомы не следует путать с термином «субъединица» для отдельных полипептидов белка.

И действительно, все рибосомы (независимо от того, к какому царству/домену живого принадлежат содержащие их клетки) состоят из двух субчастиц, *малой субчастицы* и *большой субчастицы*; обе субчастицы ассоциируют на матрице мРНК в димер – полную рибосому, которая обеспечивает биосинтез полипептида. Названия субчастицам даны по размерам: малая субчастица примерно в два раза меньше большой.

Малая субчастица состоит из рибосомной РНК (рРНК, иногда обозначают как S рРНК: S от англ. *small* - малый) длиной около 1500 нуклеотидов (для бактерий) в комплексе с двадцатью различными белками небольшого размера (около 20 кД, обозначаются как S1, S2 и т.д.). Практически все рибосомные белки имеют изоэлектрическую точку больше 10, т.е. в обычных растворах они заряжены положительно; это свойство обеспечивает эффективное взаимодействие с рРНК с образованием стабильного РНК-белкового комплекса - малой субчастицы рибосомы.

Если просто смешать все отдельные компоненты (рРНК и белки) в растворе при умеренной температуре, то произойдет *самосборка* малой субчастицы рибосом – т.е. спонтанное и специфическое образование мультимерного

супрамолекулярного комплекса; спонтанно собранная *in vitro* малая субчастица функционально активна и способна выполнять биосинтез белка. Структуру рРНК и белков можно сравнить с трехмерным паззлом, который собирается самостоятельно (при этом, конечно, не исключается динамическая конформационная подгонка всех частей такого паззла).

Большая субчастица состоит из рибосомной РНК (рРНК, иногда обозначают как L рРНК: L от англ. *large* - большой) длиной около 3000 нуклеотидов (для бактерий); кроме того, в состав большой субчастицы входит еще одна рРНК длиной 120 нуклеотидов; обе рРНК образуют комплекс с тридцатью различными белками небольшого размера (около 20 кД, обозначаются как L1, L2 и т.д.). Большая субчастица также способна к самосборке.

Скорее всего, рибосомные белки выполняют роль «фиксаторов», которые узнают и стабилизируют в критических участках сложную трехмерную структуру гигантской рРНК. Однако только структурной функцией роль рибосомных белков не ограничивается; в отдельных случаях белки прямо участвуют в формировании активных центров рибосомы.

По современным представлениям, согласно данным РСА рибосом и их функциональных комплексов, рибосома представляет собой *рибозим*, т.е. фермент, активные центры которого сформированы молекулами рРНК. И действительно, как это будет показано далее, рРНК выполняют критические функции в работе двух главных функциональных центров рибосомы: декодирующего центра малой субчастицы и пептидилтрансферазного центра большой субчастицы.

Почему биосинтез белка обеспечивает такой гигантский супрамолекулярный комплекс - молекулярная масса бактериальной рибосомы составляет около 2,5 МДа? В эн-

зимологии обычное соотношение размеров субстрата и фермента составляет около двух порядков (сравни размеры аминокислоты и соответствующих ферментов - пептидаз). Средняя молекулярная масса тРНК составляет около 28 КДа, значит ожидаемая молекулярная масса для «фермента», который осуществляет биосинтез белка должна быть около 2,8 МДа, что хорошо согласуется с молекулярной массой рибосом.

Как и предыдущие процессы ступенчатого матричного копирования - репликация и транскрипция, процесс трансляции тоже разбивается на три основных этапа: инициация, элонгация и терминация. Эти этапы соответствуют началу синтеза полипептида, росту полипептидной цепи (полимеризации) и окончанию синтеза.

Инициация. На стадии инициации происходит сборка функционального супрамолекулярного комплекса: мРНК, первой Аа-тРНК, рибосомы, и образование первой пептидной связи.

Введем линейные координаты для мРНК и обозначим как +1 первый А в стартовом кодоне AUG, все нуклеотиды слева от него пронумеруем справа налево со знаком минус. В клетках бактерий при инициации трансляции малая субчастица рибосомы «узнает» специальную последовательность на мРНК - последовательность Шайна-Дальгарно AGGAGG в области (- 3 -10); 3'-концевой участок S рРНК имеет последовательность, которая комплементарна последовательности Шайна-Дальгарно мРНК - т.н. последовательности анти-Шайн-Дальгарно CCUCCU. Это еще один яркий пример использования принципа комплементарности при функционировании нуклеиновых кислот. С бинарным комплексом мРНК*малая субчастица рибосом взаимодействует fMet-тРНК_f^{Met} - инициаторная тРНК_f^{Met}, аминокислотированная формилметионином (fMet, fM – аминокислотная группа метионина формилирована).

Для метионина существует две разные тРНК: тРНК_m^{Met} и тРНК_f^{Met}; обе они аминоацилируются одной и той же метионил-тРНК-синтетазой. Met-тРНК_m^{Met} участвует в элонгации синтеза, если в открытой рамке считывания встречается кодон AUG.

fMet-тРНК_f^{Met} является инициаторной Аа-тРНК: для того, чтобы сделать биосинтез белка направленным аминокислотной группой первой аминокислот-тРНК необходимо блокировать. Поэтому метионил-тРНК-трансформилаза формилирует Met-тРНК_f^{Met}; формильная группа образует амидную/пептидную связь с первой аминокислотой.

Далее, после образования тройного инициаторного комплекса мРНК* fMet-тРНК_f^{Met} *малая субчастица рибосомы, с ним взаимодействует большая субчастица. После объединения двух субчастиц в полную рибосому, кодон-антикодонный дуплекс располагается в т.н. *декодирующем центре* (ДЦ) малой субчастицы, а аминокислота попадает в т.н. *пептидилтрансферазный центр* (ПТЦ) большой субчастицы. Весь участок рибосомы - как на малой, так и на большой субчастице, который взаимодействует с Аа-тРНК, назван А-участком рибосомы («А» – от А-тРНК).

Далее, со следующим кодоном мРНК комплементарный дуплекс образует антикодон второй тРНК; например, если второй кодон - UUU (т.е. участок мРНК AUGUUU), то второй тРНК будет Phe-тРНК^{Phe}. Участок второй тРНК на рибосоме назван Р-участком (англ. Р – *peptidyl-tRNA*, поскольку после реакции образования пептидной связи в Р-участке находится пептидил-тРНК, см далее). Как и для первой Аа-тРНК кодон-антикодонный дуплекс попадает в ДЦ малой субчастицы рибосом, а аминокислота второй Аа-тРНК – в ПТЦ большой субчастицы.

Как ДЦ малой субчастицы рибосом проверяет правильность кодон-антикодонного взаимодействия AUG мРНК с 3'-UAC-5' тРНК? Это делают остатки двух А (1492 и 1493) в S рРНК, природа и позиция которых очень консервативна в эволюции (есть и еще участники как со стороны рРНК, так и р-белков). При образовании правильного кодон-антикодонного дуплекса мРНК-тРНК с двойной спиралью РНК, сбоку, со стороны ее малого желобка, образуются специфические водородные связи первой и второй комплементарных пар дуплекса с остатками А S рРНК малой субчастицы рибосом; при этом происходит стабилизация правильной Аа-тРНК в А-участке рибосомы. Такое взаимодействие доноров-акцепторов комплементарной пары дуплекса с остатками А рРНК с образованием тройки оснований в одной плоскости возможно только в случае точного соблюдения геометрии комплементарной пары и, следовательно, кодон-антикодонного дуплекса мРНК-тРНК. Более того, в образовании такой структуры (т.н. *А-малый мотив РНК*) участвуют 2'-гидроксилы рибозы РНК. А-малый мотив (двух типов) является каноническим мотивом РНК и довольно часто встречается в третичной структуре других РНК.

Что происходит во втором функциональном центре рибосомы – в ПТЦ? 3'-концевой Phe (F) второй тРНК попадает в ПТЦ большой субчастицы, где уже находится 3'-концевой fMet (fM), и между ними происходит пептидилтрансферазная реакция (иногда ее называют реакцией транспептидации), схема которой уже была приведена ранее. Здесь следует добавить, что эту реакцию катализирует L рРНК большой субчастицы рибосом, нуклеотиды которой участвуют не только в ориентации 3'-концов тРНК, но и катализируют саму реакцию транспептидации, выполняя тем самым функции рибозима.

После реакции, в А-участке рибосомы находится деацилированная тРНК^{fMet}, а в Р-участке рибосомы – дипептидил-тРНК: fMet-Phe-тРНК^{Phe}. При перемещении матрицы мРНК относительно рибосомы на один триплет (это процесс называется *транслокация*) деацилированная тРНК оказывается в третьем участке рибосомы, т.н. Е-участке (англ. E – *exit*, выход); дипептидил-тРНК попадает в А-участок, а Р-участок оказывается свободным и готов принять очередную Аа-тРНК, антикодон которой соответствует третьему триплету мРНК в Р-участке. Таким образом, текущий статус рибосомы оказывается аналогичным статусу самого первого этапа. Возврат в исходное состояние (с точностью до растущего пептида) определяет возможность последовательного пошагового повторения реакций наращивания полипептидной цепи. Особо отметим, что на каждом этапе образования пептидной связи на очередную Аа-тРНК в Р-участке «переносится» весь пептидный остаток из А-участка; полипептидная цепь растет в направлении от первого N-концевого fMet (fM) к С-концу, от N-конца к С-концу. Здесь уместно вспомнить, что ранее было введено правило номенклатуры записывать последовательность аминокислот в белке слева-направо от N-конца к С-концу; механизм биосинтеза белка функционально обосновал это правило.

Рибосома представляет собой молекулярную машину (наномашину). С примером молекулярных машин мы уже сталкивались раньше при изучении репликации - матричного синтеза ДНК на ДНК; репликацию выполнял сложный супрамолекулярный комплекс – реплисома, которая динамично собиралась, дополнялась, разбиралась на каждом этапе синтеза, являя собой пример динамичного интерактома. Рибосома много сложнее реплисомы, она представляет собой довольно стабильный нуклеопотеидный

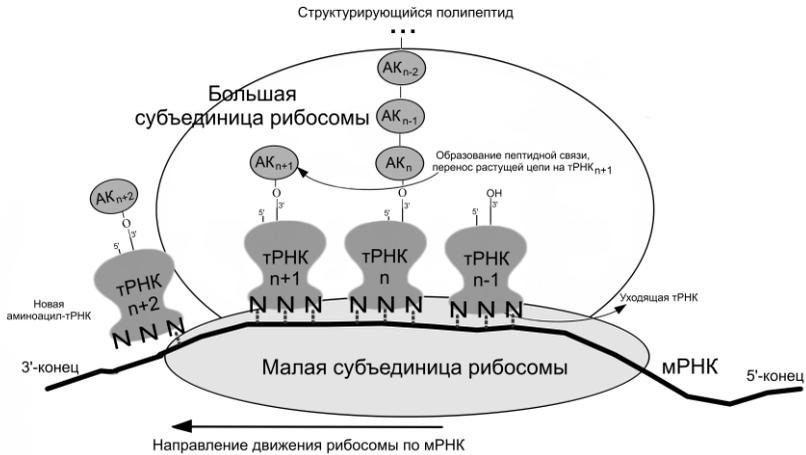


Рисунок 7.6. Схема биосинтеза белка в рибосоме

комплекс постоянного состава; транзитные взаимодействия с различными факторами помогают осуществлять процесс трансляции более быстро и точно (см. далее).

Очень интересный вопрос - за счет чего происходит передвижение рибосомы по матрице, почему это движение происходит в заданном направлении – триплеты считываются рибосомой от 5'-конца к 3'-концу мРНК? На сегодняшний день наиболее привлекательна следующая гипотеза – преобразование хаотических ненаправленных тепловых конформационных переходов рибосомы в направленное движение по мРНК за счет молекулярного механизма/устройства, которое функционирует по принципу храповика. Хорошо известный в обычной механике, храповик преобразует возвратно-вращательные движения в прерывистое движение в одном направлении, например, как в часах.

В организации очень сложного процесса трансляции принимают участие многочисленные белки – их называют *факторы трансляции*. Факторы инициации трансляции

участвуют в подготовке и формировании инициаторного комплекса; Аа-тРНК взаимодействует с рибосомой в комплексе с белковым фактором элонгации (т.н. *Tu-фактор* у бактерий, его концентрация в клетке настолько высока, что свободной Аа-тРНК практически нет); транслокацию рибосомы на один триплет также обеспечивает белковый фактор элонгации (т.н. *G-фактор* у бактерий); и, наконец, терминацию трансляции также обеспечивают факторы терминации трансляции, которые взаимодействуют со стоп-кодонами мРНК. Поскольку для трех терминирующих кодонов мРНК нет соответствующих им тРНК, то белковые факторы терминации взаимодействуют непосредственно с терминирующими кодонами мРНК и рибосома останавливается.

Очень интересным оказалась пространственная структура фактора элонгации G – форма его молекулы очень похожа на форму комплекса фактора элонгации Tu с Аа-тРНК. В связи с этим полагают следующий механизм транслокации мРНК на рибосоме: после реакции транспептидации в А-участке находится деацилированная тРНК, а в Р-участке – пептидил-тРНК; G-фактор взаимодействует с рибосомой, мимикрируя под комплекс фактора элонгации Tu с очередной Аа-тРНК; вытесняет пептидил-тРНК, связанную со своим триплетом мРНК, из Р-участка в А-участок; тем самым происходит транслокация мРНК относительно рибосомы на один триплет, при этом деацилированная тРНК попадает в Е-участок.

Еще одна интересная особенность процесса трансляции – это привлечение молекул GTP как эффикторов для функционирования факторов элонгации трансляции. Фактор элонгации трансляции Tu способен образовывать комплексы не только с Аа-тРНК, но и с GTP. Если такой тройной комплекс Аа-тРНК*Tu*GTP связывается с А-участком рибосомы правильно и образуется т.н. *продуктивный про-*

межуточный комплекс, в котором антикодон тРНК соответствует кодону мРНК, то фактор становится способным расщеплять GTP до GDP и P_i. Только после гидролиза трифосфата фактор теряет сродство к тРНК и рибосоме, переходит из комплекса в раствор и освобождает акцепторный стебель Аа-тРНК для правильного позиционирования в ПТЦ большой субчастицы.

Интересно заметить, что существуют две дискретные конформации фактора: одна, которая связана с GTP, и другая, которая связана с GDP и P_i; две конформации очень сильно отличаются друг от друга - домены белков перемещаются относительно друг друга на многие ангстремы. Подобного рода конформационные изменения белков, которые связаны с переходом белка в активную конформацию, способную катализировать химическую реакцию превращения эффекторной молекулы, являются ярким примером *молекулярных переключателей*, с которыми мы столкнёмся далее при изучении различных процессов (смотри, например, систему передачи сигнала).

Ингибиторы трансляции

Процесс трансляции занимает ключевое место в жизнедеятельности клетки; так, например, в быстро растущих клетках бактерий биосинтез рибосом и их функционирование потребляет около половины всех ресурсов: как материальных, так и энергетических. Именно поэтому многие ингибиторы трансляции являются антибиотиками, например, стрептамицин, тетрациклин и проч.

В данном курсе рассмотрим механизм действия только двух известных ингибиторов трансляции, которые вмешиваются в функционирование двух функциональных центров рибосомы – стрептомицина и пурамицина.

Стрептомицин был одним из первых антибиотиков, открытых в середине 50 г.г. прошлого века; он относится к аминогликозидным антибиотикам бактерицидного действия и на ранних этапах использования был достаточно эффективен при лечении туберкулеза.

Действие стрептомицина приводит к неправильному функционированию ДЦ малой субчастицы рибосомы (т.н. ложному кодированию). В присутствии стрептомицина рибосома способна связывать в А-участке не только правильные Аа-тРНК, но и Аа-тРНК с другими кодонами, что приводит к включению нецелевых аминокислот и образованию неправильных пептидов, т.е. к многочисленным точечным мутациям. В результате таких рибосомных ошибок при трансляции в клетке накапливаются неправильные белки, которые не могут обеспечить функционирование клетки, и она погибает. Стрептомицин связывается с S рРНК малой субчастицы рибосом в районе того самого остатка А, который формирует А-мотив с правильным кодон-антикодоновым дуплексом (см. ранее раздел «точность трансляции»). Связывание антибиотика приводит к стабилизации неправильных кодон-антикодоновых дуплексов, в результате чего в трансляции может участвовать неправильная Аа-тРНК.

Действие пурамицина ингибирует функционирование ПТЦ большой субчастицы рибосомы. Будучи производным аденозина, он связывается с Р-участком ПТЦ большой субчастицы и вызывает терминацию трансляции, поскольку блокирует участок связывания 3'-концевого А, который модифицирован аминокислотой у аминоацил-тРНК. У пурамицина аденозин диметилирован по экзоциклической аминогруппе, а 3'-гидроксил заменен на аминогруппу и

аминоацилирован тирозином (Тур, Y), гидроксил которого метилирован.

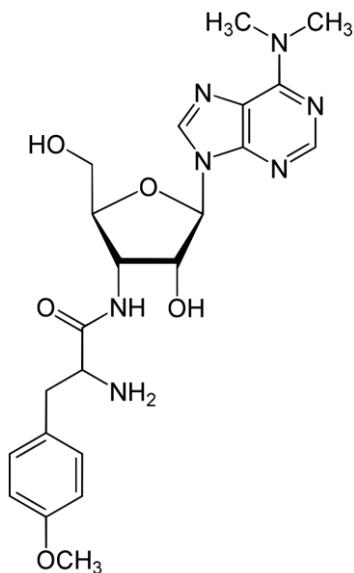


Рисунок 7.7. Пурамицин.



Часть 2
ФЕРМЕНТЫ

Введение

Живая материя характеризуется высокой химической активностью. Процессы жизнедеятельности насчитывают десятки тысяч разнообразных химических реакций, причем зачастую они протекают одновременно в пределах одного организма или даже клетки и, как правило, с весьма высокими скоростями. Дело в том, что биохимические реакции являются биокаталитическими, они ускоряются под действием биокатализаторов – ферментов.

Катализатор вообще – это вещество понижающее энергию активации химической реакции и таким образом вызывающее увеличение её скорости. Биокатализаторы – ферменты отличаются от обычных химических катализаторов высокой эффективностью и непревзойденной субстратной специфичностью. Так, например, гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы может катализироваться кислотой (протоном) и/или ферментом инвертазой. Во втором случае реакция протекает быстрее в 10 В ДВАДЦАТОЙ СТЕПЕНИ раз. Иными словами, если ферментативная реакция протекает 1 миллисекунду, то кислотнокатализируемая реакция гидролиза будет длиться более 30 миллиардов лет. Неудивительно, что химики и биологи издавна проявляли высочайший интерес к биокатализу, хотя первые рассматривали биокатализ как один из видов химического катализа, а у биологов во взглядах на биокатализ прослеживаются явные нотки витализма. Так, Луи Пастер был убежден, что биокатализ проявляется только в целостном (организованном) живом организме. Кстати, сохранившееся в русском языке наименование фермент («закваска») в отличие от слова энзим («в закваске») отражает именно точку зрения Пастера. Ярким сторонником химической природы биокатализа и биокатализаторов был выдающийся химик Юстус Либих. В это замечательное время (середина 19 столетия), когда наука, по крайней мере химия, буквально бурлила все но-

выми и новыми идеями, формирующими все новые и новые направления, в Вене стажировалась наша соотечественница Мария Михайловна Манасеина (Коркунова). Она получала бесклеточные экстракты дрожжей и показала сохранение в них сбраживающей функции.



Луи Пастер
(1822-1895)



Юстус фон Либих
(1803-1873)



Мария Манасеина
(Коркунова)
(1841-1903)



Эдуард Бухнер
(1860 – 1917)

Либих понял значимость и высоко оценил эту работу, он пригласил Манасеину поработать в его лаборатории в Германии. Однако, по семейным обстоятельствам Мария Михайловна была вынуждена вернуться в С.Петербург, где вместе с мужем она стала разрабатывать новое в медицине направление – сомнологию. Но пионерские работы Манасеиной оказались незабыты, в девяностых годах 19 века (после смерти и Пастера и Либиха) Эдуард Бухнер успешно публикует работы по ферментативной активности бесклеточных экстрактов. Именно эти работы были отмечены Нобелевской премией по химии 1907 года (М.М.Манасеина, к сожалению, умерла в 1903 году). Вообще говоря, в перечне Нобелевских премий по химии работам в области энзимологии или связанным с этой областью принадлежит весьма важная и заметная роль, их примерно пятая часть. А если добавить соответствующие работы из раздела медицины и физиологии, то список отмеченных Нобелевским Комитетом работ по ферментам становится просто внушительным. Иными словами, по крайней мере в 20 веке (я полагаю, что и сегодня) энзимология находилась на переднем крае науки. Более того, идеи и методы энзимологии часто находили и находят приложения во многих других областях науки. Впечатляющим примером такого рода служит работа Сёрена Сёренсена 1909 года, в которой автором предлагается новый количественный параметр для контроля кислотности среды ферментативных реакций. Сегодня трудно представить область естествознания, да и просто житейской практики, где не используется показатель рН, введенный Сёренсеном в 1909 году (изначально для решения исключительно задач энзимологии). Этот пример не единственный, когда энзимология оказывала серьезное воздействие на развитие всей науки. Вместе с тем история развития энзимологии сама по себе представляется весьма драматичной, но в то же время и поучительной.



Сёрен Сёренсен
(1868-1939)

Основной методический подход к исследованию ферментов и ферментативного катализа составляет конечно же кинетика. Еще на заре становления химической кинетики в середине 19 столетия пытались использовать ферментативные реакции, но не совсем удачно, поскольку ферментативная кинетика оказалась сложнее кинетики обычных химических реакций. Грамотную математическую интерпретацию кинетики ферментативных реакций дал Виктор Анри (Victor Henri) в начале 20 века (в частности, на тему закономерностей ферментативных реакций он защитил докторскую диссертацию в Парижском Университете в 1902 году). Но, что называется «увы и ах». Так называемая научная общественность оставила работы В.Анри без внимания. В наше время имя Анри можно услышать, например, в связи с интегральной формой уравнения Михаэлиса-Ментен. Это ли не парадокс, когда одна из форм базового уравнения ферментативной кинетики публикуется (в 1903 году) за 10 лет до появления самого базового уравнения (Михаэлиса-Ментен).



**Виктор (Алексеевич)
Анри**
(1872-1940)

Успех публикации 1913 года Михаэлиса и Ментен обусловлен целым рядом причин. Это и введение в практику параметра рН и, в немалой степени, проезд в Германию на стажировку молодой и энергичной канадки Мод Ментен. Она за год работы с Леонором Михаэлисом подготовила к печати замечательную статью по закономерностям ферментативной кинетики, где и было предложено уравнение известное сегодня как уравнение Михаэлиса-Ментен (математически и по сути идентичное уравнению Анри).



Мод Ментен
(1879-1960)



Леонор Михаэлис
(1875-1949)

Глава 1

Общие свойства и структура ферментов

Ферменты как природные катализаторы. Биосинтез и матурация ферментов. Локализация и источники ферментов

Ферменты являются природными катализаторами (биокатализаторами). К биокатализаторам иногда относят и другие виды катализаторов, например, рибозимы и абзимы. Мы далее будем рассматривать именно ферменты, поскольку катализ - это их основная функция, а не сопутствующая. Здесь лишь отметим, что многие природные вещества обладают каталитическими функциями, например, ионы металлов, в свободном виде и/или в виде комплексных соединений. Многие белки (не ферменты) и другие биополимеры способны проявлять каталитические функции, например, сывороточный альбумин по причине наличия в его молекуле нуклеофильных групп может катализировать некоторые гидролитические реакции. Но, как правило, упомянутые катализаторы слабоэффективные и неспецифичные в отличие от ферментов, которые как раз и характеризуются высокой эффективностью и специфичностью.

Основа ферментов – белок, но не только. К белковой основе как ковалентно, так и нековалентно присоединяются различные небелковые компоненты, как низко-, так и высокомолекулярные. В зрелом ферменте можно выделить активный центр, который участвует в связывании субстрата и его химическом превращении. В активный центр фермента могут входить функциональные группы белковой молекулы, а также он может состоять как из белковой, так и небелковой частей. В качестве небелковой компоненты могут выступать ионы металлов (например, цинка или железа, или комплексные соединения такие как гем), а также

витамины и их производные. Небелковую компоненту активного центра фермента называют простетической группой, кофактором и/или коферментом. Как правило, термин «простетическая группа» принято относить к кофакторам прочно связанным с ферментом, вплоть до образования ковалентной связи. При нековалентном связывании кофактор (кофермент) может быть отделен от белковой части. Фермент, лишенный кофактора, называют апоферментом, а апофермент с кофактором образуют холофермент. Полагают также, что активный центр в некоторых олигомерных ферментах может содержать фрагменты нескольких субъединиц и/или формируется на их стыке.

Хорошо известно, что белки строятся на базе 20 канонических аминокислот. В то же время белковая часть ферментов насчитывает более 200 различных аминокислотных остатков. Дело в том, что в подавляющем числе случаев белковая составляющая ферментов оказывается химически модифицированной. В первую очередь здесь речь идет о присоединении углеводов (посттрансляционном гликозилировании), затем о липидизации, в частности, ацилировании белка длинноцепочечными жирными кислотами. Весьма важным, особенно с точки зрения регуляции ферментов, является их фосфорилирование. Иными словами, с точки зрения химии ферменты являются гликолипопротеинами с кофакторами.

Белок, как известно, синтезируется на рибосоме. Но уже на этой стадии белок может быть снабжен гидрофобной сигнальной последовательностью для транслокации через мембрану эндоплазматического ретикула. Сигнальный пептид может отщепляться в процессе частичного (ограниченного) протеолиза. Кстати ограниченный протеолиз служит весьма важным элементом в процессе структурообразования и созревания ферментов. Так, например, собственно протеолитические ферменты синте-

зируются в виде неактивных предшественников – зимогенов и переходят в каталитически-активную форму после отщепления небольшого пептидного фрагмента, закрывающего в зимогене активный центр. Итак, на пути к ферменту белок синтезируется, сворачивается, модифицируется, ассоциируется с ионами металлов и коферментами, соединяется с другими белками и/или липидами, или даже сложными субклеточными структурами, в частности, может встраиваться в липидную мембрану. В конечном итоге, в зависимости от типа химической модификации фермент может локализоваться как в цитоплазме, так и на и даже в мембранах (становясь, соответственно, периферическим или интегральным мембранным ферментом). В некоторых случаях фермент может секретироваться, переходить из клетки в окружающую среду (так, например, пищеварительные ферменты некоторых микроорганизмов и грибов секретируются для расщепления (переваривания) внешних субстратов.

Выделение и очистка ферментов

Выбор стратегии извлечения фермента существенно зависит от вида исходного биоматериала и локализации целевого фермента. Выделение внутриклеточного фермента предполагает разрушение клетки (гомогенизацию) с последующим фракционированием образующегося материала. Обычно для грубого фракционирования используют центрифугирование или фильтрацию. Из супернатанта белки фракционно высаживают солями или органическими растворителями. В качестве соли наиболее употребимой является сульфат аммония, который (в зависимости от концентрации) позволяет довольно-таки качественно разделять белковые компоненты. Высаливание (получение белковых суспензий) является одним из распространенных приемов получения стабильных ферментных препаратов. В

основе высаливания лежит то явление, что при высокой концентрации соли в растворе усиливаются гидрофобные взаимодействия между молекулами белков, что приводит к уменьшению растворимости последних. Органические растворители (спирт, ацетон) используют более ограниченно, поскольку действие органических растворителей может приводить к инаktivации целевого фермента (эту процедуру желательнее проводить на холоду). Наиболее эффективные методы очистки ферментов заключаются в использовании колоночной хроматографии. Здесь упомянем гель-проникающую, ионообменную, гидрофобную и аффинную хроматографию. При использовании гелепроникающей хроматографии происходит разделение белков по размерам, в ионообменной хроматографии главную роль играет заряд макромолекул, гидрофобная хроматография, основанная на гидрофобных взаимодействиях, часто позволяет разделять цитоплазматические и мембранные белки, а аффинная хроматография направлена на специфическое связывание целевого белка с соответствующим (иммобилизованным) лигандом – субстратом, ингибитором, лектином, антителом и т.п.).

Критерием чистоты полученного фермента служат данные электрофореза и изоэлектрофокусировки. Здесь следует справедливости ради обратить внимание на то, что вследствие разнообразной модификации и частичного протеолиза при выделении фермента могут обнаруживаться белковые фракции с различными молекулярными характеристиками, с различными pI и даже с различными молекулярными весами.

Как правило, высокоочищенные ферменты оказываются менее стабильными, чем функционирующие в природном окружении, поэтому очень важен правильный выбор формы конечного препарата фермента. Хотя, говоря о ферменте, всегда следует иметь в виду, что мы имеем дело

именно с ферментным препаратом (он может быть поврежден или лишен того или иного фрагмента, например, гидрофобного якоря), отличающимся по структуре и свойствам от фермента, функционирующего в естественной среде *in vivo*. Конечный (коммерческий) ферментный препарат может быть в растворенном состоянии, в виде суспензии и/или в виде лиофилизованного порошка. В ряде случаев фермент может быть нанесен (иммобилизован) на подходящий носитель. И еще раз здесь отметим, что в принципе свойства ферментных препаратов (каталитическая активность, регуляция, стабильность) могут зависеть как от степени очистки, так и от формы конечного препарата.

Классификация ферментов

Поскольку основной функцией ферментов является катализ, то в основу их названий и классификаций положен тип катализируемой реакции.

Согласно классификации ферментов (КФ, ЕС) (по рекомендации Международного союза по биохимии и молекулярной биологии) все они подразделяются на 6 классов:

КФ 1 - оксидоредуктазы (катализируют окислительно-восстановительные реакции),

КФ 2 – трансферазы (катализируют перенос химических групп от одного субстрата (донора) к другому (акцептору),

КФ 3 – гидролазы (катализируют гидролиз),

КФ 4 – лиазы (или синтазы) (катализируют реакции элиминирования – отщепления воды или аммиака с образованием двойной связи),

КФ 5 – изомеразы (катализируют перестройку структуры субстрата),

КФ 6 – лигазы (или синтетазы) (катализируют образование химической связи в субстрате за счет гидролиза АТФ.

Здесь сразу же обратим внимание на условность указанного подразделения ферментов. Во-первых, фермент может катализировать несколько разных реакций. Например, гидролазы подвергают субстрат расщеплению под действием воды (гидролизу), но в присутствии дополнительных нуклеофилов (спиртов, аминов и т.п.) катализируют соответственно реакции алкоголиза и аминолиза, то есть работают как трансферазы. Во-вторых, ферменты являются истинными катализаторами, они в равной степени ускоряют как прямую, так и обратную реакции (не изменяя положения равновесия). Иными словами, в безводной или маловодной среде гидролазы будут осуществлять синтез соответствующих (исходных) соединений из продуктов и воды.

Согласно классификации, каждому ферменту присваивается четырехразрядный шифр (классификационный номер), в котором первый разряд соответствует классу фермента, второй разряд – подкласс, третий разряд – подподкласс, и, наконец, четвертый разряд – порядковый номер фермента. Например, алкогольдегидрогеназа из печени лошади имеет в классификации шифр КФ 1.1.1.1. Согласно номеру первого разряда – это оксидоредуктаза. Номер подкласса указывает на субстрат, это спирт. Номер подподкласса характеризует кофактор, в нашем случае это никотинамиддинуклеотид (НАД), в окисленной форме. Становится понятным, что шифр КФ 1.2.1.1 принадлежит альдегиддегидрогеназе.

Иногда ферменты называют тривиальными именами, часто являющимися производными от названия субстрата (или общей группы субстратов) и суффикса –аза. Такой подход понятен и разумен, когда мы имеем дело с такими

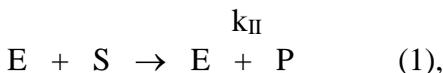
ферментами как протеиназа, липаза, уреаза. Из названий следует, что это ферменты, которые гидролизуют некий белок, некий липид (жир), мочевины, соответственно. Предполагается, что такой принцип словообразования следует использовать в случае гидролитических ферментов. Тем не менее, по такому принципу иногда формируются названия и негидролитических ферментов. Например, каталаза, пероксидаза и т.п., хотя оба указанных фермента – оксидоредуктазы, первый разлагает перекись водорода, второй окисляет субстраты (доноры электронов) перекисью водорода и/или гидроперекисями. Существуют также исторические названия, которые не всегда можно понять и соотнести с соответствующим ферментом. Если в случае трипсина, химотрипсина и пепсина можно догадаться, что речь идет о пищеварительных ферментах, то в случае ренина (протеолитический фермент в «ренин-ангиотензиновой системе» дано указание лишь на источник этого фермента (почки!), а похожее название «реннин» (с двумя «н») вообще ни с чем не ассоциируется, хотя это хорошо известный так называемый сычужный фермент, который используется в производстве сыров (расщепляет молочный белок). Это, конечно, исключения, но, как говорят, именно исключения подтверждают правила.

Глава 2

Физическая химия ферментов

Кинетика ферментативных реакций

Поскольку ферменты - это катализаторы химических реакций, то само собой разумеется, основной инструмент их исследования – химическая кинетика. С позиции кинетики реакция между двумя реагентами, ферментом (E) и субстратом (S), может описываться в рамках простой кинетической схемы (1) как реакция второго (или псевдопервого) порядка:



где P – продукт, k_{II} константа скорости второго порядка. Согласно схеме (1) начальная скорость реакции должна линейно зависеть от концентраций реагентов $[E]_0$ и $[S]_0$, соответственно. Однако, в случае ферментативных реакций при высоких концентрациях одного из реагентов (как правило, это субстрат, поскольку фермент – катализатор и берется в малых количествах) наблюдается существенное отклонение от линейности и зависимость v_0 от $[S]_0$ приобретает вид гиперболы (см. рис. 9.1).

Впервые формально-кинетическое (математическое) объяснение этому явлению дал в 1903 году Виктор Анри (за 10 лет! до публикации работы Михаэлиса и Ментен). Анри ввел в схему ферментативной реакции нековалентный комплекс между ферментом и субстратом, ES, который может образовываться как продуктивно (2), так и непродуктивно (3):

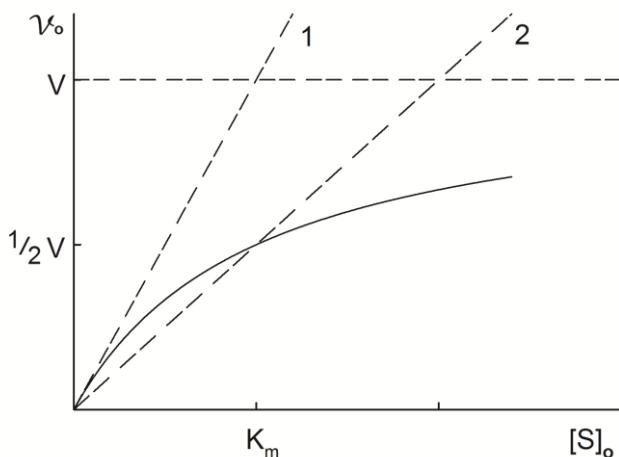
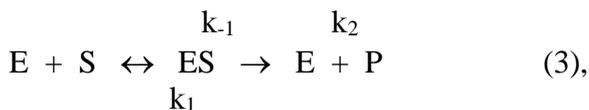
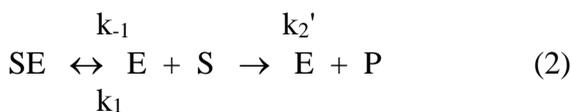


Рисунок 9.1. Зависимость начальной скорости, v_0 , ферментативной реакции от концентрации субстрата, $[S]_0$. 1 - участок линейной зависимости при малых $[S]_0$. 2 - биссектриса. См. пояснения в тексте.



где k_1 и k_{-1} константы скорости образования и диссоциации, соответственно, фермент-субстратного комплекса, k_2 и k_2' - константы скорости химического превращения субстрата (образования продукта).

Работы Анри, к сожалению, не были приняты с достойным их энтузиазмом, поскольку были теоретическими и не содержали экспериментальных обоснований.

Как мы знаем, для контроля за кислотностью реакционных смесей в случае ферментативных реакций Сёренсен ввел понятие рН только в 1909 году. В работе Михаэлиса и Ментен 1913 года был проведен грамотный эксперимент с контролем рН, который был описан в рамках кинетической схемы аналогичной схеме (3).

Как видим, в схеме (3) четыре неизвестных ($[E]$, $[S]$, $[ES]$ и $[P]$). Следовательно, для математического описания (анализа) этой схемы необходимы четыре независимых уравнения, два дифференциальных и два алгебраических:

$$d[P]/dt = k_2 \cdot [ES] \quad (4)$$

$$d[ES]/dt = k_1[E] \cdot [S] - (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] \quad (5)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (6)$$

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \quad (7),$$

где индексом «0» отмечены начальные концентрации.

Как мы уже отмечали в наиболее широко используемых условиях, когда $[S]_0 \gg [E]_0$, в уравнении (7) материального баланса по субстрату можно пренебречь величиной $[ES]$. Иными словами, для начальных скоростей, когда степени конверсии субстрата невелики ($[P] \approx 0$) будет выполняться соотношение (8):

$$[S]_0 \approx [S] \quad (8),$$

то есть наибольшую значимость для дальнейших преобразований приобретает баланс по ферменту (6), а именно

учет количественного соотношения различных форм фермента, которых в нашем конкретном случае две – свободный фермент (E), и фермент в комплексе с субстратом (ES). Подставляем соотношение (9):

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (9)$$

в дифференциальное уравнение (5) и получаем (10):

$$d[ES]/dt = k_1[E]_0 \cdot [S]_0 - (k_{-1} + k_2 + k_1[S]_0) \cdot [ES] \quad (10)$$

Комплекс ES -это промежуточное вещество в цепи превращений субстрата. Кинетическая кривая изменения концентрации промежуточных соединений имеет колоколообразный вид, то есть это кривая с максимумом. В условиях максимума по определению:

$$d[ES]/dt = 0 \quad (11)$$

Более того, в окрестностях точки максимума скорость изменения концентрации промежуточного вещества много меньше скорости изменения концентрации реагентов, в частности:

$$d[P]/dt \gg d[ES]/dt \quad (12),$$

то есть, на более или менее значительном интервале времени (в окрестностях оптимума концентрации промежуточного вещества):

$$d[ES]/dt \approx 0 \quad (13)$$

Условия неизменности или малой скорости изменения концентрации промежуточного вещества соответствуют

условиям стационарного протекания реакции. Иными словами, в стационарном режиме выражение (10) приравняем нулю:

$$k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0 - (k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]_0) \cdot [ES] = 0 \quad (14),$$

откуда

$$[ES] = (k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0) / (k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]_0) \quad (15)$$

Подставляя (15) в выражение для скорости (начальной и стационарной), v_0 , получаем:

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_0} = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (16),$$

где: $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (17)$

Уравнение (16) носит название уравнения Михаэлиса-Ментен и является базовым уравнением ферментативной кинетики. K_m носит название константы Михаэлиса и иногда также называется субстратной константой. Дело в том, что k_{-1} в уравнении Михаэлиса-Ментен это константа скорости первого порядка диссоциации нековалентного фермент-субстратного комплекса, тогда как k_2 константа скорости химического превращения комплекса в продукты (см. также схему (3)). Разумно предположить, что $k_{-1} \gg k_2$, то есть:

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \approx k_{-1} / k_1 = K_s \quad (18),$$

где K_s - это собственно и есть «субстратная константа», константа диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Действительно, в рамках кинетической схемы (3) константа Михаэлиса в силу соотношений (18) характеризует средство фермента к субстрату. Уравнение Михаэлиса-

Ментен (16) является, как мы еще не раз убедимся, достаточно универсальным, но физический смысл константы Михаэлиса и наблюдаемой каталитической константы $k_2 \equiv k_{\text{kat}}$ может меняться.

Отметим, что уравнение (16) математически является уравнением гиперболы. При малых концентрациях субстрата (когда $[S]_0 \ll K_m$) скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата, реакция имеет первый порядок по субстрату. При больших концентрациях субстрата (когда $[S]_0 \gg K_m$) зависимость скорости реакции от концентрации субстрата выходит на плато, по величине соответствующее максимальной скорости реакции $v = k_{\text{kat}} \cdot [E]_0$. В этом режиме порядок реакции по субстрату нулевой.

Принимая во внимание соотношение (18) при анализе кинетических схем ферментативных реакций мы можем использовать как условия стационарности, так и условия равновесия: соотношение (18) свидетельствует, что равновесное образование фермент-субстратного комплекса не нарушается (равновесие не смещается) из-за протекания химической реакции превращения комплекса в продукт. В качестве упражнения рассмотрим схему Анри с непродуктивным образованием фермент-субстратного комплекса (2). В рамках схемы (2):

$$v_0 = d[P]/d[t] = k_2' \cdot [E] \cdot [S] \quad (19)$$

Как и в случае вышеописанного анализа схемы Михаэлиса и Ментен (при тех же условиях) полагаем что $[S] = [S]_0$ и рассматриваем только баланс по ферменту, чтобы определить концентрацию свободной формы фермента:

$$[E]_0 = [E] + [SE] = [E] \cdot (1 + [S]_0/K_S') \quad (20),$$

$$\text{где } K_S' = ([E] \cdot [S])/[SE].$$

С учетом соотношения (20) уравнение (19) преобразуется в (21):

$$[E]_0 = [E] + [SE] = [E] \cdot (1 + [S]_0/K_S') \quad (21)$$

Роль константы Михаэлиса Михаэлиса в уравнении (21) играет константа диссоциации непродуктивного комплекса SE, а каталитическая константа:

$$k_{\text{kat}} = k_2' \cdot K_S' \quad (22)$$

Каталитическая константа здесь, как видим, более сложная (хотя и остается константой скорости первого порядка), соответствует произведению константы скорости второго порядка k_2 и константы комплексообразования K_S' . Тем не менее, особо отметим, что формально разные схемы (2) и (3) описываются схожим уравнением типа уравнения Михаэлиса-Ментен. Справедливости ради следует признать, что схема (2) в случае ферментативного катализа маловероятна, процесс образования продуктивного фермент-субстратного комплекса принципиально важен для снижения энергии активации (собственно для каталитического эффекта). Однако, непродуктивное связывание вполне реально может происходить и, таким образом, осложнять протекание катализируемой ферментом реакции. Такая ферментативная реакция может быть описана схемой:



где K_S и K_S' , соответственно, константы диссоциации продуктивного, ES, и непродуктивного, SE, фермент-субстратного комплексов, k_0 каталитическая константа скорости первого порядка.

Математический анализ кинетической схемы (22) приводит к уравнению для начальной скорости:

$$V_0 = \frac{\frac{k_0 \cdot K_S'}{K_S + K_S'} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{\frac{K_S \cdot K_S'}{K_S + K_S'} + [S]_0} \quad (23)$$

Как видим, и в этом случае конечное уравнение имеет вид уравнения Михаэлиса-Ментен, но наблюдаемые параметры, константа Михаэлиса и каталитическая константа, другие, а именно:

$$k_{\text{кат, каж}} = k_0 \cdot K_S' / (K_S + K_S') \quad (24)$$

$$K_{\text{м, каж}} = K_S \cdot K_S' / (K_S + K_S') \quad (25)$$

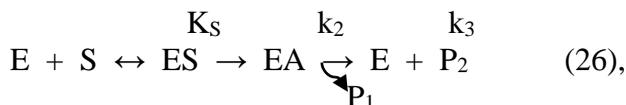
Несмотря на весьма сложный вид наблюдаемых величин $k_{\text{кат, каж}}$ и $K_{\text{м, каж}}$, их отношение имеет вид попроще и по проще:

$$k_{\text{кат, каж}} / K_{\text{м, каж}} = k_0 / K_S \quad (26)$$

Соотношение (26) отражает третий! параметр уравнения Михаэлиса-Ментен. k_0 / K_S это константа второго порядка, характеризующая энергию перехода из основного состояния фермента и субстрата в активированное состояние. Этот параметр не искажается особенностями формирования и характеристиками промежуточных фермент-субстратных комплексов, поскольку характеризует простую бимолекулярную реакцию фермента с субстратом типа (1). Константа k_0 / K_S отражает также эффективность ферментативного катализа, поскольку именно эту констан-

ту сравнивают с константой скорости (также второго порядка) некаталитической или модельной реакции.

Рассмотренные нами выше примеры включали нековалентные фермент-субстратные комплексы. Однако, в общем случае промежуточные формы фермента могут быть ковалентно модифицированными. Так, в случае многих гидролаз в процессе катализа обнаруживается формирование промежуточных соединений типа ацилфермента. Рассмотрим далее классическую трехстадийную кинетическую схему (26):



где EA – ацилфермент, P₁ и P₂ основной и кислотный продукты, соответственно.

Скорость ферментативной реакции (26) может быть измерена как по продукту P₁, так и P₂:

$$d[P_1]/dt = k_2 \cdot [ES] \quad (27)$$

$$d[P_2]/dt = k_3 \cdot [EA] \quad (28)$$

В стационарном режиме:

$$d[EA]/dt = k_2 \cdot [ES] - k_3 \cdot [EA] = 0 \quad (29)$$

То есть в стационарном режиме скорости реакции, определяемые по разным продуктам одинаковы, равны между собой:

$$k_2 \cdot [ES] = k_3 \cdot [EA] \quad (30)$$

Используя соотношение (30) в уравнении материального баланса по ферменту, получаем:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EA] \quad (31)$$

Для свободной формы фермента получаем:

$$[E] = [E]_0 / (1 + ([S]_0 / K_S) \cdot (1 + k_2 / k_3)) \quad (32)$$

Подставляя (31) в выражение для начальной скорости реакции, получаем:

$$v_0 = k_2 \frac{[E] \cdot [S]_0}{K_S} = \frac{\frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_S \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} + [S]_0} \quad (33)$$

Сразу же отметим, что уравнение (33) имеет вид уравнения Михаэлиса-Ментен, где:

$$k_{\text{кат, каж}} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad (34)$$

и
$$K_{\text{м, каж}} = K_S \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (35)$$

Оба параметра имеют сложный вид, причем K_m однозначно не отражает сродство субстрата к ферменту, а существенно зависит от соотношения констант скорости ацилирования и деацилирования, k_2 и k_3 . В то же время отношение $k_{\text{кат, каж}} / K_{\text{м, каж}}$ как мы уже отмечали ранее соответствует константе скорости второго порядка k_2 / K_S . В зави-

симости от соотношения величин k_2 и k_3 лимитирующая скорость реакции (наименьшая, а потому скорость определяющая) может быть как ацилирование ($k_2 \ll k_3$), так и деацилирование ($k_3 \ll k_2$). В первом случае (34) и (35) упрощаются до:

$$\begin{aligned} k_{\text{кат, каж}} &= k_2 \\ K_{\text{м, каж}} &= K_S \end{aligned} \quad (36)$$

Во втором случае эта пара параметров представлена в виде:

$$\begin{aligned} k_{\text{кат, каж}} &= k_3 \\ K_{\text{м, каж}} &= K_S \cdot \frac{k_3}{k_2} \end{aligned} \quad (37)$$

Как видно, скорость лимитирующая константа определяет величину наблюдаемой каталитической константы, $k_{\text{кат, каж}}$, а в первом случае, при $k_2 \ll k_3$, трехстадийная кинетическая схема (26) упрощается до двухстадийной схемы (3). Еще раз подчеркнем, что в случае $k_3 \ll k_2$ наблюдаемая константа Михаэлиса является кинетическим параметром, она не характеризует сродства фермента к субстрату, а по величине существенным образом зависит от соотношения констант k_2 и k_3 . Резюмируя этот раздел можно заключить, что факт подчинения ферментативной реакции уравнению Михаэлиса-Ментен не свидетельствует о кинетической схеме и механизме реакции, множество различных схем описываются схожим уравнением. Объединяет все рассмотренные схемы наличие нековалентного фермент-субстратного комплекса. Но, как известно, во всяком правиле можно найти исключения. Так и здесь, если, например, допустить, что в схеме (26) НЕТ нековалентного фермент-субстратного комплекса, а ацилфермент (в общем случае некая неактивная форма фермента, в

частности, неактивный конформер, E*) образуется в бимолекулярной реакции фермента с субстратом:



где неактивная форма фермента, E*, превращается в активную, E, (релаксирует) по реакции первого порядка:



Совместное рассмотрение реакций (38) и (39) приводит к выражению для начальной стационарной скорости:

$$v_0 = \frac{k_I \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{\frac{k_I}{k_{II}} + [S]_0} \quad (40)$$

типа уравнения Михаэлиса-Ментен, где роль каталитической константы играет константа первого порядка реактивации фермента (39), а в роли константы Михаэлиса выступает отношение констант первого и второго порядка, k_I/k_{II} (это соотношение имеет, как и K_m , размерность концентрации).

Описанная кинетическая схема (38)-(39) и уравнение для скорости реакции (40) отражают феномен смены лимитирующей стадии (от второго порядка при низких концентрациях субстрата к первому по ферменту и нулевому по субстрату при высоких его концентрациях, в так называемой области насыщения по субстрату). Иными словами, уравнение Михаэлиса-Ментен (или просто уравнение гиперболы) является универсальным, описывающим множе-

ство различных реакций протекающим по различным механизмам и различным схемам.

Определение кинетических параметров уравнения Михаэлиса-Ментен

Каноническое уравнение Михаэлиса-Ментен (16) можно записать в несколько ином виде (41):

$$v_0 = \frac{k_{kat} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{V \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{[S]_0}} \quad (41)$$

Последнее выражение представляет собой функцию насыщения, показывающее степень достижения величины V в зависимости от соотношения K_m и $[S]_0$. Здесь обратим внимание, что для гиперболы, описываемой уравнением (41) значение V соответствует асимптоте. Как видно из уравнения (41) реальная скорость v_0 составляет $0,9V$, когда $[S]_0$ превышает величину K_m в 10 раз, а при стократном превышении K_m скорость v_0 на 1% ниже максимальной. Таким образом, в кинетических экспериментах, в которых допускается 10% погрешность, условием насыщения (достижения максимальной скорости будет использование субстрата в концентрациях не менее 10 раз превышающих константу Михаэлиса, K_m . В уравнении (41), являющимся одной из форм уравнения титрования субстратом фермента, достаточно четко прослеживается физический смысл K_m . При равенстве концентрации субстрата и K_m . наблюдаемая скорость составляет половину от максимальной (это точка эквивалентности, когда половина фермента находится в связанной форме (в виде, например, фермент-субстратного комплекса), а половина в свободной форме). Таким образом, если зависимость v_0 от $[S]_0$ достигает насыщения (V), то значение $[S]_0$, при котором наблюдае-

мая скорость составляет $V/2$, соответствует величине K_m (см. рис. 1).

При малых величинах концентраций субстрата ($[S]_0 \ll K_m$) наблюдается линейная зависимость v_0 от $[S]_0$, причем тангенс угла наклона этой зависимости, как это следует из (41) равен V/K_m , то есть определяет константу скорости второго порядка $k_{кат}/K_m$.

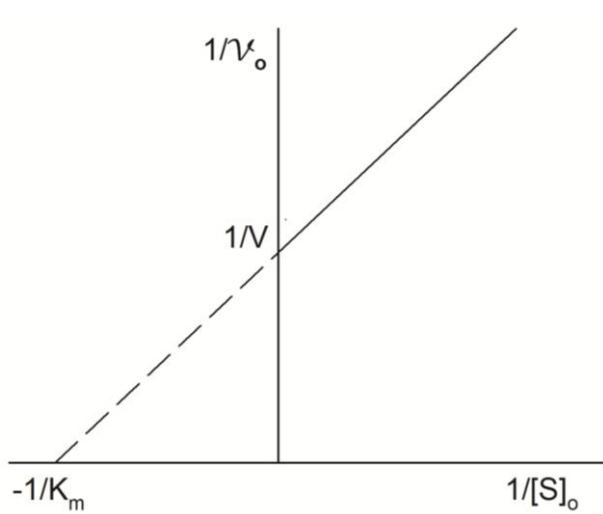
Пересечение начальной линейной зависимости с асимптотой (V) по координате соответствует K_m . Если положение асимптоты определяется нечетко, или вообще не определяется, величины V и K_m можно оценить по координатам пересечения биссектрисы угла наклона начального участка кинетической кривой ($v_0 = 1/2 \cdot V/K_m \cdot [S]_0$) с самой кинетической кривой (см. рис.1). Это безусловно удобный прием *оценки* величин кинетических параметров уравнения (41), а также критерий самой возможности отдельного определения соответствующих кинетических параметров, потому что в условиях $[S]_0 \ll K_m$ биссектриса начального угла и реальная кинетическая кривая просто не пересекаются.

Более корректным решением задачи отдельного определения параметров уравнения Михаэлиса-Ментен (41) лежит в использовании так называемых линейных анаморфоз гиперболического уравнения Михаэлиса-Ментен. Наиболее популярным (а я бы сказал даже и правильным) является представление экспериментальных результатов зависимости начальной скорости от концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера-Берка, Рис.9.2). Согласно уравнению (42), полученному при соответствующей трансформации исходного уравнения (41):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (42)$$

Экспериментальные точки соответствуют прямой с наклоном K_m/V , отсекающей на оси ординат $1/V$, а на оси абсцисс значение $-1/K_m$.

Рисунок 9.2. Анаморфоза Лайнуивера-Берка (двойные обратные координаты).



Есть и другие виды линейных анаморфоз уравнения (41) (например, в методе Иди-Хофсти, где анализируется зависимость v_0 от $v_0/[S]_0$), но значимость метода Лайнуивера-Берка заключается еще и в том, что на рис.2 четко прослеживается соотношение интервала используемых концентраций субстрата и определяемой величины K_m (что свидетельствует о ее достоверности и/или вероятности ошибки).

В заключении этого раздела нельзя не упомянуть метод Корниш-Боудена раздельного определения кинетических параметров уравнения Михаэлиса-Ментен. Корниш-Боуден обратил внимание на то, что гипербола, описываемая уравнением (41) имеет две асимптоты, пересекающиеся в точке с координатами $-K_m$ и V . Иными словами, для раздельного определения параметров уравнения Михаэлиса нужно найти всего одну точку, точку пересечения асимптот анализируемой гиперболы. Точку пересечения асимптот можно определить по относительно несложной процедуре: если провести вспомогательные прямые через координаты точек принадлежащих гиперболе (Рис. 9.3), то они все пересекутся в искомой точке, точке пересечения асимптот, одновременно определяя величины искомых кинетических параметров V ($k_{кат}$), K_m и V/K_m ($k_{кат}/K_m$).

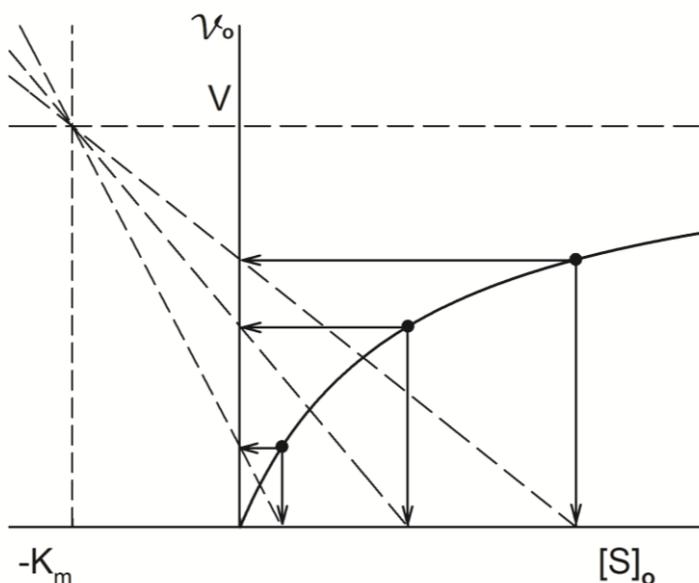


Рисунок 9.3. Оценка V и K_m по методу Корниш-Боудена (см. пояснения в тексте).

Регуляция кинетических параметров ферментативных реакций

Как мы видели в предыдущих разделах, скорость ферментативной реакции определенным образом зависит от концентрации фермента и субстрата (субстратов). В природе есть немало веществ, способных как субстрат или иным образом взаимодействовать с ферментом и изменять его свойства, в частности, реакционную способность. Речь здесь в первую очередь идет об ингибиторах (I), избирательно подавляющих скорость ферментативной реакции за счет связывания с активным центром фермента (к этой категории эфффекторов следует отнести и антогонисты ингибиторов, активаторы (A)). Скорость ферментативной реакции, как мы уже знаем, весьма чувствительна к кислотности среды, к рН, к другим характеристикам среды, таким как ионная сила, μ , и/или диэлектрическая проницаемость, ϵ . Существенным образом скорость любой химической реакции, в том числе и ферментативной, зависит от температуры (T), а также может меняться во времени (t). Иными словами, скорость ферментативной реакции может оказаться весьма сложной многопараметровой функцией вышеуказанных параметров (43):

$$v = f ([E]_0, [S]_0, [I]_0, [A]_0, \text{pH}, \mu, \epsilon, T, t, \dots) \quad (43)$$

Далее мы более подробно рассмотрим как наиболее важные эффекты ингибирования, рН и температурные эффекты.

Ингибирование ферментативных реакций

Ингибирование ферментативных реакций - это подавление (снижение) их скорости путем взаимодействия эфффектора с активным центром фермента. Такое взаимодействие может быть как необратимым (ковалентным), так и

обратимым (нековалентным). Как мы уже отмечали, во всяком правиле есть свои исключения. Например, борная кислота и её органические (арил- и алкил-) производные способны образовывать эфирную связь с гидроксилом серина в активном центре ряда гидролаз. При этом борная кислота является типичным обратимым (более того, слабым) ингибитором. С другой стороны, многие белковые ингибиторы нековалентно, но прочно (за счет множественности нековалентных связей) взаимодействуют с соответствующими ферментами, проявляя эффект необратимости.

Существует довольно-таки простой тест на характер ингибирования. Он заключается в разбавлении реакционной системы. Если эффективность ингибирования ($v_0/v_{0,i}$) снижается при разбавлении, значит ингибирование обратимое (часть связанного ингибитора диссоциирует из фермент-ингибиторного комплекса), а если эффективность ингибирования не меняется при разбавлении, то ингибирование разумно считать необратимым.

Необратимое ингибирование

Необратимые ингибиторы взаимодействуют с ферментом либо как модифицирующие агенты (из объема, бимолекулярно):



где I – ингибитор, EI – прочный фермент-ингибиторный комплекс, k_1 – константа скорости реакции ингибирования (второго порядка), либо по “псевдосубстратному» типу (45):



где EI – обратимый фермент-ингибиторный комплекс (аналогичный фермент-субстратному в схеме (3)), EI' – прочный (ковалентный) комплекс, K_i – константа образования (диссоциации) комплекса EI, k_i – константа скорости образования комплекса EI'.

При избытке ингибитора (в сравнении с концентрацией фермента), также как и в случае рассмотренных ранее ферментативных реакций. Кинетика ингибирования представляется достаточно простой:

$$E = E_0 \cdot e^{-k_{i,набл} \cdot t} \quad (46),$$

где в случае схемы (44):

$$k_{i,набл} = k_i \cdot [I]_0 \quad (47),$$

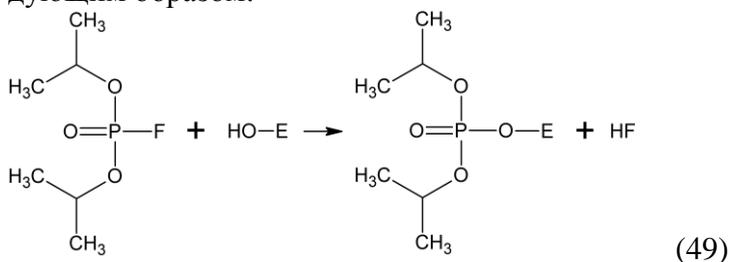
а в случае схемы (45):

$$k_{i,набл} = \frac{k_i \cdot [I]_0}{K_i + [I]_0} \quad (48)$$

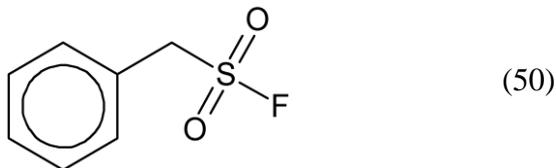
Видно, что выражение (48) имеет «михаэлисовский» вид, что позволяет использовать необратимые ингибиторы наряду с субстратами для выяснения взаимосвязи структуры (эффектора) и реакционной способности (фермента). При использовании необратимых ингибиторов по зависимости остаточной ферментативной активности от концентрации добавленного ингибитора можно успешно определять концентрацию активных центров фермента (титровать фермент).

Необратимые ингибиторы сыграли важную роль в энзимологии для идентификации функциональных групп активных центров. Так, например, фторангидриды фосфорорганических (фосфоновых) кислот (к которым относятся

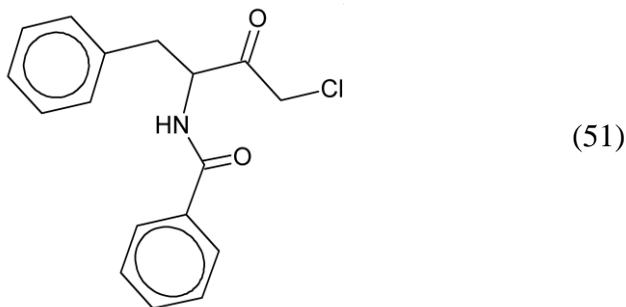
многие боевые отравляющие вещества) ацилируют (фосфорилируют) гидроксил серина, входящего в активный центр так называемых сериновых протеиназ, а также и ряда других ферментов, например, ацетилхолинэстеразы. В случае диизопропилфторфосфата реакция выглядит следующим образом:



Аналогично с сериновыми протеиназами взаимодействует такой хорошо известный необратимый ингибитор как фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ, PMSF):



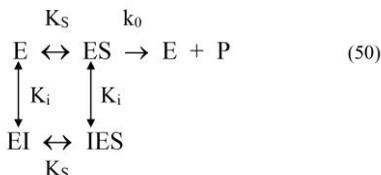
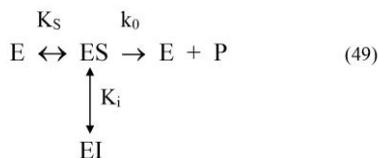
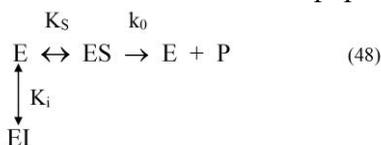
А хлорметилкетоны, например, реактив Шоу, алкилируют в сериновых протеиназах имидазол гистидина активного центра.



Как видно, необратимые ингибиторы - удобный инструмент для целенаправленного введения в активные центры ферментов специфического маркера – метки - хромофорной, флуоресцентной, спиновой и т. п. Необратимые ингибиторы на практике в энзимологии находят применение в процедурах выделения и очистки ферментов. Дело в том, что при гомогенизации биоматериалов, при разрушении клеток из лизосом высвобождаются протеазы, способные разрушать белки, в том числе и целевые ферменты. Такой явно нежелательный процесс протеолиза можно существенно подавить, добавив необратимые ингибиторы, например, диизопропилфторфосфат (49) и/или ФМСФ (50).

Обратимое ингибирование

Классификация обратимых инбиторов ферментов строится на схеме Михаэлиса-Ментен (3). В основе этой схемы фигурируют две формы фермента – свободный фермент (E) и связанный (ES). Ингибитор может взаимодействовать (связываться) либо с формой E, либо с формой ES, либо одновременно с обеими этими формами:



В случае первой схемы (48) фермент образует комплекс либо с субстратом, либо с ингибитором (образование тройного комплекса типа ESI здесь невозможно). Иными словами, ингибитор конкурирует с субстратом за связывание с ферментом. Этот тип ингибирования и называют **конкурентным**. Кинетический анализ схемы (48) приводит к выражению (51) для скорости ферментативной реакции ($v_{0,i}$):

$$v_{0,i} = \frac{k_0 \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_{m,каж} + [S]_0} \quad (51),$$

где

$$K_{m,каж} = K_S \cdot \left(1 + \frac{[I]_0}{K_i}\right) \quad (52)$$

Иными словами, в случае конкурентного ингибирования ферментативная кинетика имеет «Михаэлисовский» вид, но константа Михаэлиса является кажущейся и представляет собой функцию концентрации ингибитора в соответствии с уравнением (52).

Как видно из Рис. 9.4, в случае конкурентного ингибирования снижается наклон линейного участка зависимости v_0 от $[S]_0$ при малых концентрациях субстрата, тогда как положение асимптоты (величины максимальной скорости реакции, V , не изменяется (см. также Рис. 9.5).

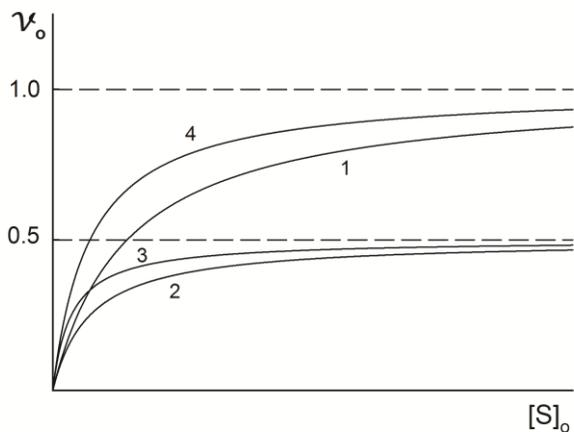


Рисунок 9.4. Кинетические эффекты обратимых ингибиторов: 1 - конкурентного, 2 - неконкурентного, 3 - бесконкурентного, 4 - реакция без ингибитора. $[I]_0 = K_i$.

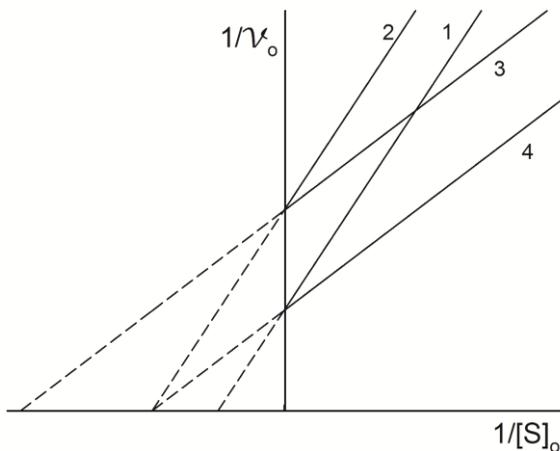


Рисунок 9.5. Эффекты обратимых ингибиторов в двойных обратных координатах. Обозначения см. в подписи к рис.4.

Константу ингибирования (K_i) определяют по наклону линейной зависимости $K_{m,каж}$ от концентрации ингибитора (см. уравнение 52). Если ингибитор связывается и со свободным ферментом, и с фермент-субстратным комплексом, то есть в реакционной системе образуется тройной комплекс IES (схема (50)), то такое ингибирование называется **неконкурентным** (субстрат и ингибитор за связывание с ферментом не конкурируют). Анализ схемы неконкурентного ингибирования (50) приводит к выражению для скорости реакции (53):

$$v_{0,i} = \frac{k_{кат,каж} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (53)$$

где

$$k_{кат,каж} = \frac{k_0}{1 + \frac{[I]_0}{K_i}} \quad (54)$$

Иными словами, зависимость скорости от концентрации субстрата при неконкурентном ингибировании (Рис. 9.4 кривая 2) сохраняет Михаэлисовский вид (см. выражение (53)), но величина каталитической константы является кажущейся, представляющей собой функцию концентрации ингибитора (см. выражение (54)). Константу неконкурентного ингибирования, K_i , находят по тангенсу наклона линейной зависимости $k_0 / k_{кат,каж}$ от концентрации ингибитора:

$$k_0 / k_{кат,каж} = 1 + [I]_0 / K_i \quad (55)$$

И, наконец, случай (49), когда ингибитор обнаруживает способность связываться только с фермент-субстратным комплексом (делая его неактивным, неспособным к пре-

вращению в продукты), носит название **бесконкурентного** ингибирования. Анализ схемы (49) приводит к выражению (56) для зависимости начальной стационарной скорости от концентрации субстрата:

$$v_{0,i} = \frac{k_{\text{кат,каж}} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_{\text{м,каж}} + [S]_0} \quad (56),$$

где $k_{\text{кат,каж}} = k_0 / (1 + [I]_0 / K_i)$ (57)

и $K_{\text{м,каж}} = K_m / (1 + [I]_0 / K_i)$ (58)

Иными словами, в случае бесконкурентного ингибирования уравнение для скорости ферментативной реакции формально сохраняет Михаэлисовский (гиперболический) вид, но его кинетические параметры становятся кажущимися и изменяются в присутствии ингибитора (см. уравнения (57) и (58)), причем отношение $k_{\text{кат,каж}}$ к $K_{\text{м,каж}}$ (а это константа эффективности второго порядка) от концентрации ингибитора не зависит и равно k_0 / K_m . Как видно на Рис. 9.5 в координатах Лайнуивера-Берка случай бесконкурентного ингибирования описывается прямой (серией прямых при изменении концентрации ингибитора), параллельной исходной зависимости (без ингибитора) (прямые (1) и (4) на Рис. 9.5). Величину константы бесконкурентного ингибирования можно определить из зависимости от концентрации ингибитора как $k_{\text{кат,каж}}$ (используя линейную анаморфозу (55)), так и $K_{\text{м,каж}}$ (или $K_{\text{м,каж}} / K_m$), в соответствии с уравнением (58).

Иногда на практике в качестве меры ингибирующей способности используют величину I_{50} , соответствующую концентрации ингибитора вызывающей двухкратный эффект подавления ферментативной активности. Как видно

из Рис. 9.4, эффективность ингибирования ($v_0/v_{0,i}$) в случае конкурентного ингибитора снижается по мере увеличения концентрации субстрата, а для бесконкурентного ингибитора, наоборот, эффективность ингибирования растет с ростом концентрации субстрата. И только в случае неконкурентного ингибирования эффективность ингибирования не зависит от концентрации субстрата (поскольку ингибитор воздействует только на кажущуюся каталитическую константу). И только в этом последнем случае I_{50} имеет ясный физический смысл: $I_{50} = K_i$.

pH – Зависимости скорости ферментативных реакции

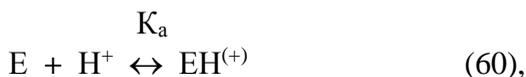
pH-Эффекты в ферментативном катализе могут быть весьма затейливыми и многоликими. Дело в том, что по своей сути наблюдаемые pH-эффекты обусловлены участием в реакции тех или иных ионогенных групп, чье состояние и реакционная способность меняются с изменением кислотности (pH) реакционной среды. Это могут быть функциональные группы фермента, а также субстрата и/или эффектора. Более того, таких групп может быть несколько (если не сказать – много), особенно если принять во внимание, что фермент - это полиэлектролит. Следует также принять во внимание, что наблюдаемые кинетические параметры могут быть сложными, причем их составляющие в свою очередь могут по-разному меняться при варьировании pH.

Однако, в простейших случаях (а их в ферментативном катализе немало) pH-эффекты относительно просты, однозначно анализируются и интерпретируются. Так, в частности, протон (H^+) формально может выступать как обратимый ингибитор, если допустить, что его связывание с ферментом (соответствующей ионогенной группой активного центра) приводит к образованию неактивной формы. Не-

трудно догадаться, что формально это действие протона будет описываться выражением типа (57):

$$k_{0,\text{каж}} = k_0 / (1 + [\text{H}^+] / K_a) \quad (59),$$

где вместо концентрации ингибитора будет фигурировать концентрация протонов (H^+), а вместо K_i будет выступать соответствующая константа ионизации K_a :



$$\text{где} \quad K_a = [\text{E}] \cdot [\text{H}^+] / [\text{EH}^{(+)}] \quad (61)$$

Несмотря на формальное сходство выражений (57) и (59) анализ рН-зависимостей все-таки имеет свою специфику. Дело в том, что концентрация эффектора на практике варьируется как правило в пределах одного десятичного порядка, тогда как варьирование концентрации протонов может достигать масштабов 12 и даже более десятичных порядков. Как хорошо известно, для характеристики кислотности среды обычно используют параметр «рН», причем $\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$. Короче, при анализе рН-зависимостей, описываемых выражением типа (59) используют один из следующих четырех приемов. Первый прием - это метод подбора, или метод последовательных приближений, когда для подобранных пар параметров k_0 и K_a строят с использованием уравнения (59) теоретические зависимости, стремясь найти оптимальное соответствие теоретической кривой и экспериментальных данных. Кстати, основным критерием грамотности и корректности анализа рН-зависимостей, как правило, служит соответствие теоретической кривой и положения экспериментальных данных

(точек). Второй прием – классическое использование линейной анаморфозы. Так на базе выражения (59) имеем:

$$k_{0, \text{каж}}^{-1} = k_0^{-1} + k_0^{-1} \cdot K_a^{-1} \cdot [\text{H}^+] \quad (62)$$

Представляя экспериментальные данные в координатах уравнения (62) ($k_{0, \text{каж}}^{-1}$ против $[\text{H}^+]$) из отрезка на оси ординат находим k_0 , а из наклона наблюдаемой прямой (или отрезка на оси абсцисс) находим K_a . Следующие два приема оперируют параметром рН, здесь мы используем либо полулогарифмические координаты ($k_{0, \text{каж}}$ и/или $k_{\text{кат, каж}}$ против рН), либо двойные логарифмические ($\lg(k_{0, \text{каж}})$ и/или $k_{\text{кат, каж}}$ против рН). Уравнение (59) нельзя прологарифмировать что называется «в лоб», но можно рассмотреть так называемые крайние случаи. При условии $[\text{H}^+] \ll K_a$ (рН >> рК_а) зависимость типа (59) выходит на плато, принимая значение k_0 в полулогарифмических координатах (Рис. 9.6А) или $\lg(k_0)$ в двойных логарифмических координатах (Рис.9.6Б). На Рис.9.6, а мы видим классическую кривую титрования (переход фермента из формы $\text{EH}^{(+)}$ в Е. На этой кривой (Рис.9.6А) точка эквивалентности ($[\text{E}] = [\text{EH}]$, $k_{0, \text{каж}} = \frac{1}{2} \cdot k_0$) указывает на оси абсцисс величину константы ионизации фермента, точнее $\text{pK}_a = -\lg K_a$. В случае двойных логарифмических координат в области кислых (малых) значений рН, когда $\text{H}^+ \gg K_a$, а рН < рК_а на Рис.9.6Б наблюдается линейная зависимость с единичным наклоном, $\text{tg } \varphi = + 1$. Дело в том, что в указанных условиях уравнение (59) может быть упрощено и трансформировано в линейное логарифмическое уравнение:

$$\lg k_{0, \text{каж}} = \lg k_0 - \text{pK}_a + \text{pH} \quad (62)$$

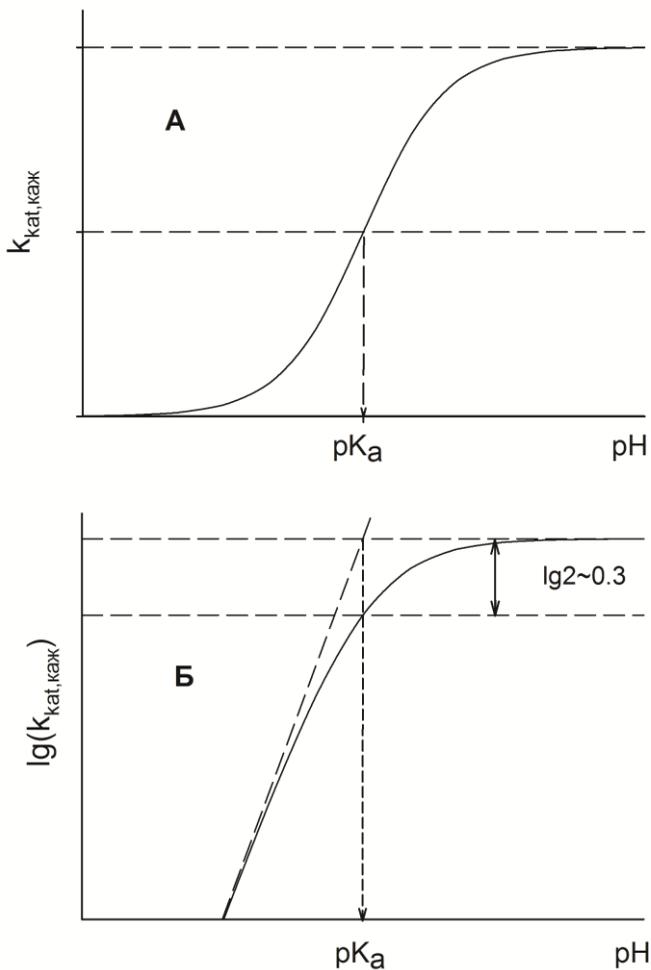
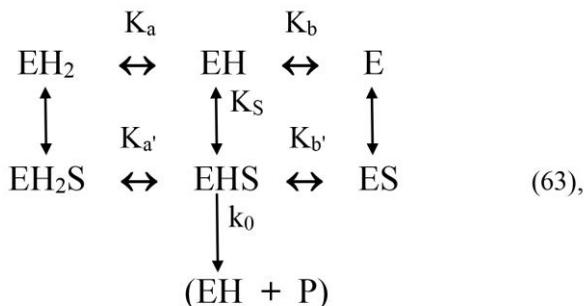


Рисунок 9.6. Полулогарифмические (А) и логарифмические (Б) координаты в анализе pH-зависимостей. Пояснения см. в тексте.

Точка пересечения наклонной прямой (описываемой уравнением (62)) и плато ($k_{0, \text{каж}} = k_0$) имеет координату на оси абсцисс « pK_a ». Если в эксперименте по тем или иным причинам (например, из-за инактивации фермента в кислых средах) трудно достоверно видеть наклонную асимптоту с единичным наклоном и, соответственно, трудно ее использовать для определения pK_a , оценку pK_a проводим по значению экспериментальной константы $\lg(k_{0, \text{каж}})$, находящейся на $\lg 2$ (примерно 0,3 единицы) ниже плато (см. рис.6Б). Именно в этих условиях по определению $K_a = [\text{H}^+]$, а $\text{pH} = \text{pK}_a$. Напомним, что в любом случае основным критерием корректности анализа служит соответствие экспериментальных данных теоретической кривой, построенной для определенной пары значений k_0 и K_a .

Как уже отмечали, pH – зависимости скорости ферментативной реакции могут быть весьма сложными, в зависимости от количества проявляющихся в эксперименте ионогенных групп и эффективности их влияние на связывание субстрата и реакцию способную соответствующего фермент-субстратного комплекса. Наиболее часто наблюдаемой зависимостью является колоколообразная, когда фермент оказывается активным в узком диапазоне pH , а при закислении и/или защелачивании среды его активность падает до нуля. Описание этого случая дается относительно простой кинетической схемой:



где K_a и K_b константы ионизации соответствующих форм свободного фермента, а $K_{a'}$ и $K_{b'}$ константы ионизации аналогичных форм фермент-субстратного комплекса.

Анализ схемы (63) показывает, что в этом случае скорость реакции описывается привычным нам уравнением типа Михаэлиса-Ментен:

$$v_0 = \frac{k_{kat, каж} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_{m, каж} + [S]_0} \quad (64),$$

где $k_{kat, каж} = \frac{k_0}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a'}} + \frac{K_{b''}}{[H^+]}}$ (65)

и $K_{m, каж} = K_S \cdot \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a'}} + \frac{K_{b''}}{[H^+]}}$ (66)

Из анализа $k_{kat, каж}$ от рН (по процедуре аналогичной вышеописанной) находим $pK_{a'}$, $pK_{b'}$ и величину рН-независимой константы k_0 , а для определения pK_a и pK_b используем рН-зависимость отношения $k_{kat, каж}$ к $K_{m, каж}$:

$$\frac{k_{kat, каж}}{K_{m, каж}} = \frac{k_0}{K_S \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}\right)} \quad (67)$$

(см. Рис. 9.7 А и Б, соответственно).

Температурные зависимости скорости ферментативных реакций

Количественные характеристики ферментативного катализа представлены целым набором как равновесных (K_s , K_i , K_a и так далее), так и кинетических параметров ($k_{\text{кат}}$, k_i , k_0/K_m и так далее). И те, и другие, как правило, весьма чувствительны к температуре.

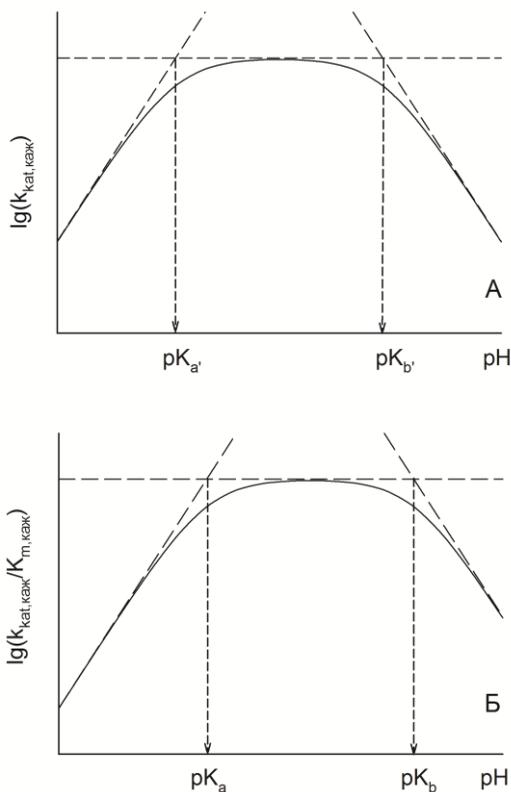


Рисунок 9.7. Анализ колоколообразных зависимостей скорости ферментативной реакции от pH. А – зависимость $\lg(k_{\text{кат, каж}})$. Б – зависимость $\lg(k_{\text{кат, каж}}/K_m)$

Что касается кинетических констант, то здесь картина более-менее ясная, с ростом температуры, как хорошо известно, усиливается тепловое движение реагирующих молекул, растет их энергия и соответственно увеличивается доля, преодолевающих энергетический барьер. Однако, в случае ферментативных реакций помимо классического воздействия

температуры может наблюдаться и изменение состояния (формы) фермента, обусловленного изменением температуры (перестройка (например, диссоциация) надмолекулярных форм, конформационные переходы, обратимая денатурация) и, наконец, фермент может подвергаться (и подвергается) необратимой денатурации (инактивации), протекающей по различным кинетическим механизмам. Наложение разнонаправленных температурных эффектов приводит к тому, что при увеличении температуры скорости ферментативных реакций, как правило сначала повышаются, а затем, после достижения некоторой «оптимальной температуры» начинают снижаться. Традиционный анализ скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при различных температурах часто приводит к весьма необычным и даже неожиданным (отрицательные значения энергии активации!) зависимостям соответствующих параметров.

Однако рассмотрим все по порядку, или по мере усложнения. Как принято в химии, зависимости равновесных параметров от температуры следует анализировать прежде всего в соответствии с классическим уравнением:

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{acc}} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (68),$$

где K_{acc} - константа ассоциации.

Напомним, что для характеристики ферментов и ферментативного катализа обычно используют константы дис-

социации, такие как K_s , K_i , K_a и так далее. Далее переходим к уравнениям Вант-Гоффа:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{R \cdot T^2} \quad (69)$$

$$\frac{d \ln K}{d(1/T)} = - \frac{\Delta H}{R}$$

На графике в координатах « $\ln(K)$, $1/T$ » получаем линейную зависимость, из наклона которой следует величина изменения энтальпии, ΔH . В принципе в ферментативном катализе наблюдаемые значения ΔH могут быть как положительными, так и отрицательными и даже нулевыми. Последний случай, как правило, указывает на гидрофобную природу исследуемого процесса комплексообразования.

Для анализа температурных зависимостей констант скорости ферментативных реакций можно использовать классическое уравнение Аррениуса:

$$k_r = k_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (70),$$

где k_r наблюдаемая константа скорости реакции, E_a энергия активации.

В соответствии с уравнением Аррениуса строим зависимость $\ln(k)$ от обратной температуры и по наклону наблюдаемой прямой находим величину энергии активации реакции, E_a . По теории абсолютных скоростей:

$$k_r = \frac{k_B \cdot T}{\hbar} \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{R \cdot T}} = \frac{k_B \cdot T}{\hbar} \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{R \cdot T}} \cdot e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (71),$$

где ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии активации, k_B - константа Больцмана, \hbar – постоянная Планка.

На графике в координатах $\ln(k_{\text{кат}}/T)$ от $1/T$ по величине наклона наблюдаемой прямой определяем энтальпию активации, ΔH^\ddagger . Энтальпию активации можно определить если известна энергия активации, E_a , поскольку из соответствующих сравнений (70) и (71) следует простое соотношение:

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (72)$$

Конечно, определение соответствующих термодинамических параметров составляет основную задачу анализа температурных зависимостей скорости ферментативных реакций, но не менее важным оказывается выяснение термостабильности исследуемого фермента и выявление изломов на аррениусовских зависимостях (обычно здесь принято предполагать конформационный переход фермента, либо смену лимитирующей стадии реакции).

Здесь также отметим, что если в химических реакциях энергия активации по определению имеет положительную величину, в энзимологии зависимость $\ln(k_{\text{кат}})$ от $1/T$ может оказаться весьма непростой, вроде представленной «зигзагообразной» кривой на Рис. 9.8. Это лишь означает, что определяемые при изучении температурных зависимостей ферментативных реакций наблюдаемые характеристики и термодинамические параметры являются кажущимися и часто не позволяют придать им строгий физический смысл.

Отметим здесь также и то, что для характеристики состояния фермента и некоторых процессов комплексообразования успешно применяются прямые методы калориметрии, в частности ДСК, дифференциальная сканирующая калориметрия.

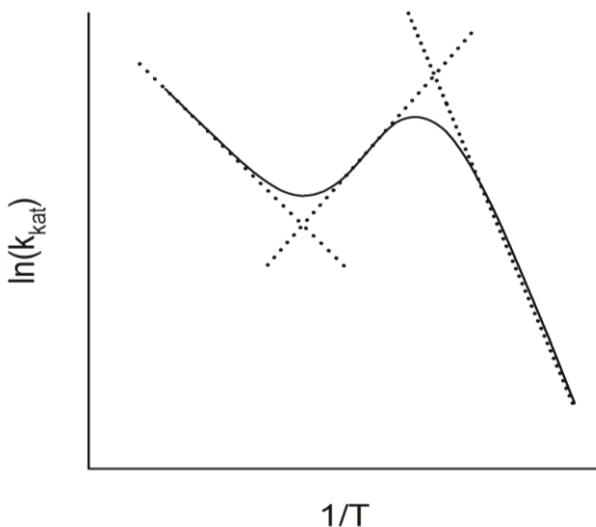


Рисунок 9.8. Зигзагообразная зависимость в координатах уравнения Аррениуса. Пояснения см. в тексте.

Физико-химические причины ускорения ферментативных реакций

Чтобы между реагентами А и В (Е и S) прошла реакция, их надо просто сблизить, хотя при этом желательно их сориентировать так, чтобы взаимодействовать смогли нужные атомы, а также неплохо было бы увеличить реакционную способность реагирующих частиц. Иными словами, в качестве важных факторов ускорения следует обратить внимание на эффекты сближения, ориентации и эффекты среды (играющие важную роль в повышении реакционной способности). Величину вклада эффекта сближения можно оценить, если представить ситуацию, когда молекулы реагента А (или В) окажутся в окружении исключительно молекул В (или, соответственно, А). Такую ситуацию можно реализовать, если молекулы растворителя вокруг А (или В) заменить соответственно реагентом В

(или А). В водном растворе, в котором мы преимущественно и рассматриваем протекание ферментативных реакций концентрация растворителя (воды) 55 М. Эта величина и дает фактор ускорения, связанный со сближением. Размерность этого фактора указывает на то, что мы реакцию второго порядка перевели в первый (внутримолекулярный режим), соотношение констант первого и второго порядков дает величину концентрации, чем по смыслу и является рассматриваемый концентрационный эффект.

Аналогичным образом можно оценить и эффект ориентации. Только здесь в качестве объема, в котором нужно сконцентрировать реагенты, по-видимому, разумно рассмотреть объем, соответствующий колебанию образующейся связи ($\delta V \approx 0,5 \cdot 10^{-31}$ л), что приводит к эффективному соотношению констант k_I/k_{II} около 10^7 М.

Что касается увеличения реакционной способности, то здесь обратим внимание прежде всего на изменение среды. Фермент переносит реакцию из воды в микроокружение активного центра, что сопровождается дегидратацией реагирующих частиц, снижением Ван-дер-Ваальсовых радиусов, и в целом, усилением реакционной способности, например, в нуклеофильной реакции. Кроме того, в зависимости от характера микросреды могут существенно измениться локальные значения рН и рК ионогенных групп.

Если сравнить некаталитическую и каталитическую реакцию (путь 1 и путь 2 на Рис. 9.9) фермента структуры X-E и субстрата структуры Y-S (где X и Y – взаимодействующие атомы, то можно отчетливо видеть, что каталитическая реакция идет по другому пути с другой (меньшей!) энергией активации. Формальное различие в активированных состояниях, приведенных на Рис. 9.9 сводится к наличию в случае каталитической реакции комплекса между E и S (комплекса Михаэлиса). В этой связи разумно допустить, что именно на стадии нековалентного

комплексообразования фермента и субстрата формируется благоприятное по структуре переходное состояние. На важность взаимодействия фермента и субстрате в ферментативном катализе обратил внимание еще Эмиль Фишер, выдвинув концепцию **ключа и замка** (Рис. 9.10, 1).

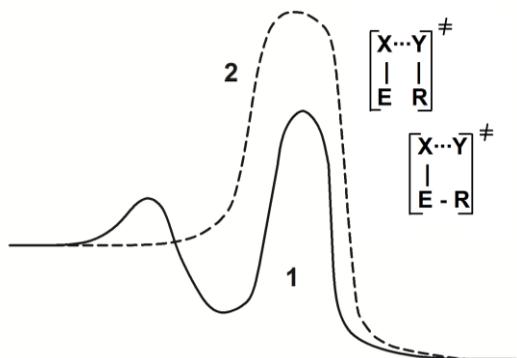


Рисунок 9.9. Диаграмма изменений стандартной свободной энергии каталитической реакции (1-й путь) и некаталитической реакции (2-й путь).



Эмиль Герман Фишер
(1852 – 1919)



Дэниел Эдвард Кошланд
(1920 - 2007)

Здесь и фермент, и субстрат имеют достаточно жесткие структуры, которые подходят друг к другу как ключ к замку, образуя единый комплекс. В развитие концепции Фишера, для объяснения природы и движущих сил каталитического эффекта Даниэл Кошланд предложил **теорию индуцированного соответствия** (Рис. 9.10, 2).

По Кошланду субстрат имеет «жесткую» структуру, а фермент – «мягкую», меняющуюся и способную подстраиваться под субстрат, формируя высоко реакционноспособное состояние. С этих позиций особенно хорошо понятна субстратная специфичность ферментативного катализа. Наглядное снижение энергии активации следует из концепции «дыбы» или «напряжений», предложенной и развитой Уильямом Дженксом.

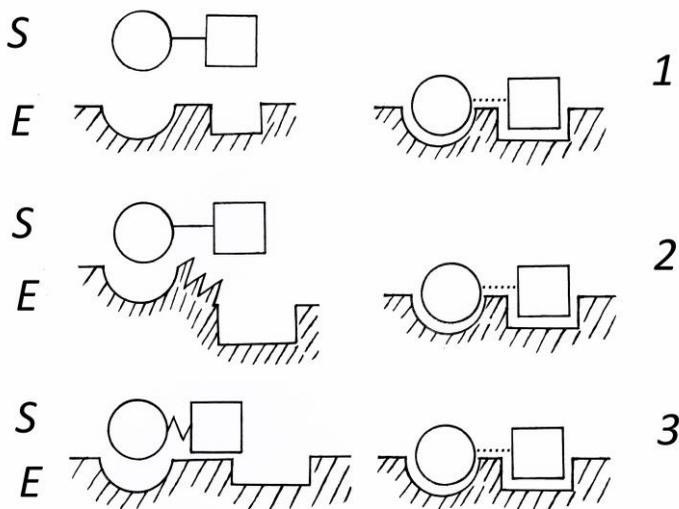


Рисунок 9.10. Механизмы. **1** – «ключа и замка», **2** – «индуцированного соответствия», **3** – «напряжения» («дыбы»).



**Уильям Дженкс
(1927 - 2007)**

В концепции Дженкса фермент – «жесткий», который при связывании «мягкого» субстрата способен деформировать его молекулу, ослабляя разрываемую связь.

В свою очередь все перечисленные концепции ферментативного катализа, несмотря на, казалось бы, очевидные отличия, можно объединить, если допустить, что фермент в принципе настроен не на субстрат (в основном состоянии), а на его **переходное состояние**. Фермент на стадии формирования нековалентного комплекса Михаэлиса связывает субстрат в форме близкой по структуре к переходному состоянию, стабилизируя его и облегчая переход через активационный барьер. С этим предположением хорошо согласуется правило Ноулеса – «лучшее связывание – лучший катализ». Наблюдаемое (см. Рис.9.9) снижение энергии переходного состояния в случае каталитической реакции соответствует энергии связывания субстрата в фермент-субстратный комплекс. Иными словами, суть теорий ферментативного катализа заключается в демонстрации вклада в понижение энергии активации энергии сорбции субстрата на ферменте.

Химические механизмы ферментативного катализа

Принципиальной особенностью ферментативного катализа в отличие от классического гомогенного является то, что в активных центрах ферментов формируются и функционируют ансамбли, состоящие из нескольких функциональных групп. В гомогенном катализе индивидуальные функциональные группы могут выступать, например, как общее основание или общая кислота, как электрофил или нуклеофил. На ферменте, как правило, соответствующие группы объединяются в ансамбли, в которых происходит усиление действия (активация) той или иной индивидуальной группы. Так, в α -химотрипсине формируется не простой нуклеофил, а составной, состоящий из трех функциональных групп, кстати, расположенных в разных удаленных друг от друга участках полипептидной цепи, но оказывающиеся в нужном пространственном расположении вблизи друг друга (на расстоянии связи) в свернутой молекуле нативного фермента. Непосредственную нуклеофильную атаку на субстрат осуществляет гидроксил серина-195 активного центра. Однако, здесь отметим, что алифатический гидроксил (например, в спирте) очень слабый нуклеофил (слабее воды) (его $pK > 16$). Особенность остатка серина в α -химотрипсине заключается в том, что расположенный рядом с ним имидазол гистидина-57 как общее основание взаимодействует с протоном серина, перетягивая его на себя. Это действие аккомпонирует и усиливает аспартат-102 присоединяющий к себе протон с гистидина. Как видно триада серин (195)-гистидин(57)-аспартат(102), формирующая составной нуклеофил α -химотрипсина, представляет собой цепь переноса протона, превращает гидроксил серина в алкоксид-ион с высокой нуклеофильной активностью (сильнее щелочи!). pK серина в составном нуклеофиле около 8, значит активация его прошла почти в миллиард раз. Субстрат (пептид) связыва-

ется с ферментом и фиксируется для правильной ориентации по крайней мере в трех точках (в гидрофобный карман фермента погружается боковой ароматический радикал расщепляемого аминокислотного остатка, R, в основном гидрофобно связывается группа R' – NH – субстрата, а кислород карбонильной группы субстрата формирует водородную связь с остатком глицина-196, подставляя таким образом углерод карбонила атаке составного нуклеофила фермента. Кстати все эти взаимодействия сохраняются в переходном состоянии, стабилизируя его (понижая энергию). Алкоксид-ион серина по нуклеофильному механизму атакует углерод карбонила сорбированного субстрата. В результате этой атаки образуется ацилфермент (с ковалентной связью между серином и ацильной частью субстрата) и отщепляется основной продукт. Деацилирование ацилфермента с образованием кислотного продукта и регенерацией свободного активного фермента происходит в результате атаки воды (точнее гидроксила, образующегося в результате активирующего действия тандема «имидазол гистидина - карбоксилат аспарагина» (См. схему на Рис. 9.11).

Аналогичный составной нуклеофил есть еще у целого ряда других ферментов (различающихся специфичностью). У этих ферментов по-разному устроен сорбционный участок активного центра. Так у описанного выше α -химотрипсина в активном центре есть большой гидрофобный карман, предназначенный для связывания ароматического бокового радикала гидролизуемого аминокислотного остатка (с дополнительной его фиксацией образованием π -комплекса (с находящимся в кармане остатком триптофана).

В случае трипсина, гидролизующего в белках и пептидах пептидную связь, образованную положительно заряженными аминокислотными остатками (лизина и аргини-

на) в «гидрофобном кармане» сорбционного субцентра находится отрицательный заряд.

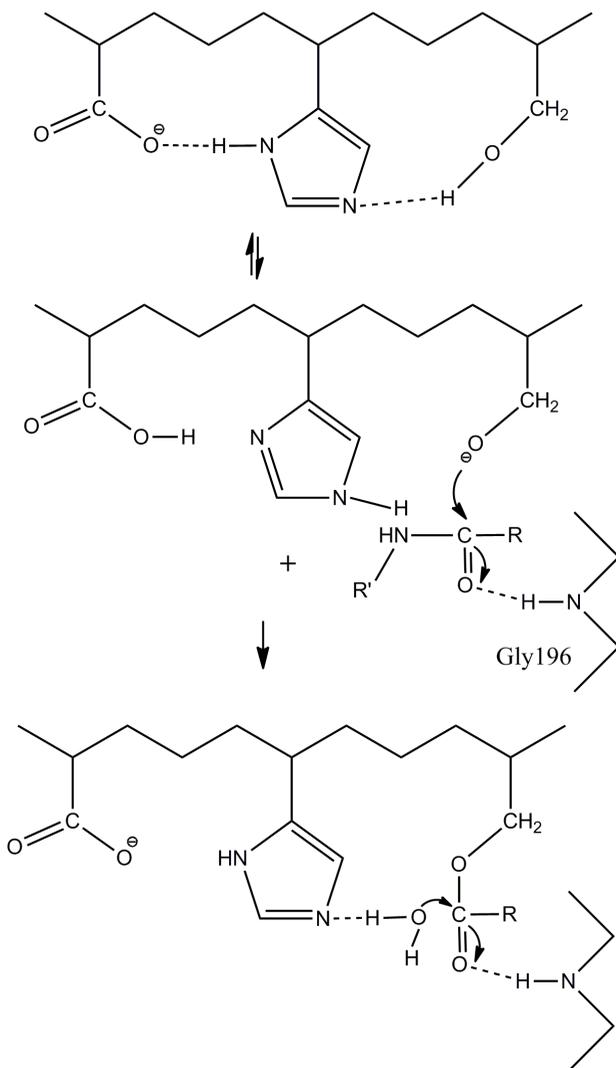


Рисунок 9.11. Схема катализа α -химотрипсином.

Кстати в результате частичной инактивации трипсина отрицательный заряд из его активного центра может удаляться, и такая форма трипсина обнаруживает α -химотрипсино-подобную активность.

В эластазе, специфичной к гидролизу пептидных связей образованным аланином, гидрофобный карман очень «мелкий», способный вместить только метильную группу.

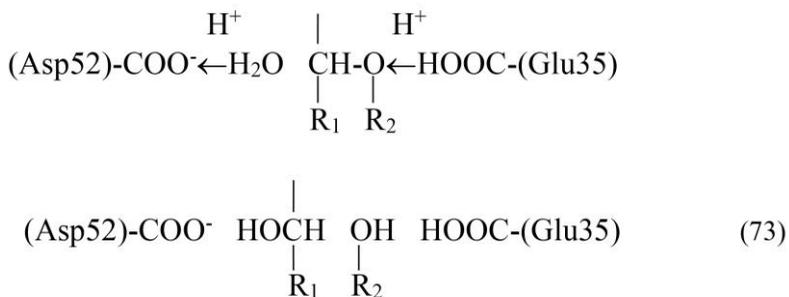
В рибонуклеазе нуклеофила как такового в активном центре нет, но имеющийся там имидазол гистидина (His-12) активирует нуклеофил на субстрате (2'-гидроксил), который атакует фосфор в фосфате и образует в качестве промежуточного вещества циклофосфат (аналогично ацилферменту).

В папаине в качестве нуклеофила активного центра выступает высоко реакционноспособная тиольная группа, для дополнительной активации которой оказывается достаточно одной имидазольной группы (His-159).

У карбоксипептидазы активация воды (до гидроксила) происходит в координационной сфере Zn^{2+} активного центра. Там же локализуется карбонильная группа субстрата (Zn^{2+} работает как электрофил).

У кислых протеаз (в частности, пепсина, работающего в желудке) формируется тандем из двух карбоксильных групп (точнее одной протонированной карбоксильной группы и одного депротонированного карбоксилата остатка аспарагиновой и/или глутаминовой кислот. Они образуют непосредственно цепь переноса протона от общей кислоты к общему основанию, а могут включать и других участников, например, субстрат и/или воду.

Работа аналогичного тандема в лизоциме показана на схеме:



Как видно на схеме, одна карбоксильная группа (протонированная) осуществляет общий кислотный катализ, тогда как вторая (депротонированная) работает как общее основание. Отметим, что в цепь переноса протона основу которой составляют две группы активного центра фермента оказываются включенными и молекула воды и субстрата. Вероятность формирования устойчивой частицы из многих компонентов в гомогенном растворе представляется маловероятной по «энтропийным» причинам, а на ферменте и более сложные ситуации реализуются во «внутримолекулярном режиме»

К настоящему времени детальные химические механизмы установлены и описаны для сотен ферментов разных классов.

Глава 3

Прикладная энзимология

Биотехнология и прикладная энзимология

Человечество использует биотехнологию с незапамятных времен. Однако, собственно термин «биотехнология» был предложен и вошел в практику относительно недавно, менее ста лет назад. Этот термин предложил венгерский инженер Карл Эреки для процедуры промышленного выращивания свиней на сахарной свекле. Кстати, несмотря на свое узкое и конкретное занятие, Эреки в термин «биотехнология» вкладывал весьма четкий и широкий смысл - это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты». Можно видеть, что под это определение хорошо подходит все классическое сельское хозяйство, которое конечно же является одной из ветвей биотехнологии, тем более, что современное сельское хозяйство все в большей степени становится на промышленные рельсы. Речь здесь идет и о крупномасштабном промышленном животноводстве, и о промышленном птицеводстве, и о растениеводстве в тепличных хозяйствах. Немало известно о (полу)промышленном производстве рыбы и морепродуктов, даже производстве черной икры в искусственных водоемах с компьютерным контролем. Особого упоминания заслуживают также многочисленные процессы ферментации в производстве продуктов питания, напитков, чая, табака, фармацевтических препаратов, а также разнообразных химических веществ, включая растворители. Ферментацию можно рассматривать как самостоятельную ветвь биотехнологии, которая для своих целей оперирует с различными микроорганизмами и является ничем иным как промышленной микробиологией. Прикладная энзимология также может использовать целые клетки, в том числе микробные,

но основной ее задачей является **биокатализ**. Для этой цели могут использоваться как чистые ферменты, так и грубые ферментные препараты, включая субклеточные частицы и, как мы уже отмечали, целые клетки. Самым древним примером этого плана было использование сычужного фермента (ренина из желудка телят) для производства сыра («правильного» гидролиза молочного белка казеина). Этот процесс используется и поныне, хотя к телячьему ферменту в настоящее время добавили и ферменты других источников, включая генноинженерные (рекомбинантные).

В целом отметим, что хотя вся химическая энзимология как самостоятельное научное направление стала активно развиваться еще в 19 веке и не в последнюю очередь в надежде получения эффективных катализаторов в химических процессах, эта мечта мало по малу стала осуществляться с немалой задержкой во времени. Дело в том, что выделенные из живой материи ферменты оказались весьма капризными, а главное неустойчивыми – они довольно-таки быстро теряли свою каталитическую активность. Само собой разумеется как природные субстанции с очень низким содержанием в исходных материалах ферменты и век назад и сейчас как правило товар весьма дорогостоящий. Более того ферменты, как (макро)-молекулы, относятся к псевдогомогенным катализаторам и, следовательно, их трудно отделить от продуктов катализируемой реакции и вообще при необходимости извлечь из реакционной среды. Грубо говоря ферменты как катализаторы представляются малотехнологичными, плохо регенерируются, дороги и нестабильны. Между тем во второй половине 20 века стали появляться работы, в которых ферменты наносили на различные материалы. Такие ферменты стали называть **иммобилизованными**. Оказалось, что иммобилизованные ферменты как правило характеризуются более высокой стабильностью. Иммобилизованные фер-

менты механически легко вводить в реакцию и извлекать из реакционной среды, в том числе отделять от продуктов.

Именно на базе иммобилизованных ферментов сформировалась современная прикладная энзимология, использующая ферменты и ферментные препараты как катализаторы многих практически значимых процессов.

Иммобилизация ферментов

Под иммобилизацией ферментов подразумевается, как правило, связывание ферментов (E) с тем или иным (нерастворимым) носителем (X) с использованием сшивающих (бифункциональных) агентов (L) и/или без сшивки. Иными словами, под иммобилизацией ферментов как правило предполагают создание конструкций типа «E-L-X». Тем не менее, уже здесь отметим, что термин «иммобилизация» предполагает процедуру ограничения подвижности фермента (воздействие на поступательное, вращательное и/или колебательное движение молекулы фермента, и не более того). Ограничить подвижность фермента можно и без носителя, путем, например, сшивки (наложения химических скобок) молекулы фермента, а также по-простому, путем ограничения пространства в котором локализован фермент, по отношению ко всей реакционной системе. Последний случай легко представить и реализовать при использовании полупроницаемых мембран, а также в более широком смысле ограничение локализации характерно для гетерогенных систем, например, в двухфазных системах вода/несмешивающийся с водой органический растворитель, где фермент локализован исключительно в воде, причем объемная доля водной фазы может быть весьма малой. Добавим, что подобные двухфазные системы, где фермент локализован в воде, а субстрат (и продукт) могут распределяться между фазами, достаточно популярны, поскольку в них в широких пределах можно регулировать наблюдае-

мое равновесие катализируемой реакции и соответствующим подбором природы органического растворителя и соотношения объемов фаз достигать количественных выходов конечного (целевого) продукта.

Носители для иммобилизации ферментов

В качестве носителей для иммобилизации ферментов могут быть использованы разнообразные (практически любые) твердые материалы неорганической и органической природы. Чистые металлы (например, золото) используют для иммобилизации ферментов с целью получения ферментных электродов для аналитических систем. Эффективно связываются ферменты на оксидах металлов (например, TiO_2), гидроксидах ($Al(OH)_3$), солях, алюмосиликатах, глинах, стеклах, различных композитах, оксидах и гидроксидах неметаллов (например, на силикагеле, чистых неметаллов (например, на графите – как и в случае с золотом широко используемом для получения ферментных электродов. Среди материалов органической природы в первую очередь отметим большое количество разнообразных природных биополимеров, белков и полисахаридов. Трудно перечислить используемые как носители разнообразные синтетические полимеры и сополимеры. Липиды часто используют для дополнительной модификации (изменения гидрофильно-липофильного баланса) поверхности носителя. Самостоятельно липиды также используют как носители при иммобилизации на монослои, бислойные мембраны, плоские и замкнутые – везикулы (липосомы). Ферменты могут быть включены в состав прямых и/или обратных мицелл поверхностно-активных веществ (или природных липидов) в воде или органических растворителях, а также в органогелях.

Носители, как мы уже выше отметили, могут быть модифицированы, в том числе химически, чтобы изменить

свойства поверхности и/или дополнительно ввести на поверхность носителей те или иные функциональные группы.

Методы физической иммобилизации

Физическая иммобилизация фермента на носителе (без образования ковалентных связей) может происходить либо путем адсорбции (фиксации фермента на поверхности носителя), либо абсорбции (включения фермента в объем носителя). Хотя, как уже выше отмечалось, при физической иммобилизации не предполагается образование ковалентных связей, взаимодействие может быть очень прочным, настолько, что фермент с носителя не смывается даже большим объемом растворителя (воды или буфера). Дело в том, что при физической иммобилизации как при адсорбции, так и при абсорбции могут формироваться многоточечные в том числе кооперативные взаимодействия из нескольких слабых связей (водородных, ионных), фермент может работать как поверхностно-активное вещество (снижая поверхностную энергию), в целом стабилизируя взаимодействие фермент-носитель. Следует также отметить, что в ряде случаев (не столь уж редких) наблюдается «необратимый» характер адсорбции фермента на носителе во времени, что не исключает и формирование ковалентных связей между ферментом и носителем. К физическому типу иммобилизации следует отнести не только адсорбцию (и абсорбцию) свободного фермента на носителе, но и формирование носителя в среде, содержащей фермент. Здесь, в первую очередь, речь идет о получении полимерных гелей, микрокапсулировании и микрогранулировании ферментов (а также нанокапсулировании и наногранулировании). Классическим примером такой иммобилизации может служить захват фермента в альгинатный гель при добавлении растворимых солей кальция к смеси фермента

и альгината натрия. Аналогичная картина наблюдается при полимеризации смеси фермента с соответствующими мономерами и сшивающими агентами, например, при включении ферментов в полиакриламидный гидрогель, и другие сшитые полимерные гели. Включение фермента в полимерный носитель может стать необратимым если есть возможность варьировать размер пор носителя, например, температурой, растяжением полимерного материала с последующей релаксацией и так далее.

Химические методы иммобилизации ферментов

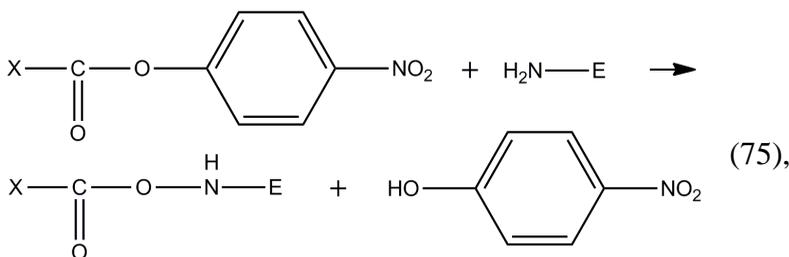
Как мы уже отмечали, для иммобилизации ферментов могут быть использованы материалы различной химической природы. Иными словами, на носителе, в принципе, могут быть любые химические группы, по выбору экспериментатора. На ферменте также, в принципе, может быть любая функциональная группа (в частности, она может быть специально введена в молекулу фермента, присоединена к белку, или к небелковой части, например, к углеводу в гликопротеине). Однако, в повседневных случаях мы обычно имеем дело (в порядке убывания реакционной способности) с сульфгидрильными группами, аминогруппами и карбоксильными группами. Сульфгидрильных групп на ферментах обычно мало, к тому же они часто входят в активные центры и участвуют в катализе, либо формируют дисульфидные мостики, фиксирующие нужную конформацию белка и, вообще, стабилизирующие молекулу фермента. А вот амино- и карбоксильных групп на белках, как правило, достаточно много (вспомним, что белки - это полиэлектролиты). Бывают, конечно, исключения. Так, в пепсине (молекула состоит из 340 аминокислотных остатка всего две аминогруппы. Но, как известно, исключения лишь подтверждают правила, и, как правило белковая мо-

лекула весом 25-30 kDa содержит десяток, а то и больше аминокрупп.

Тем не менее, отметим, что задействовать сульфгидрильные группы белков можно легко и в относительно мягких условиях, их можно ацилировать, алкилировать и окислять. В прикладном отношении очень важной является реакция тиол-дисульфидного обмена, с помощью которой можно как иммобилизовать фермент, так и защитить эту группу, в частности в активном центре, например, в папаине, на время хранения и/или химических манипуляций с ферментом:

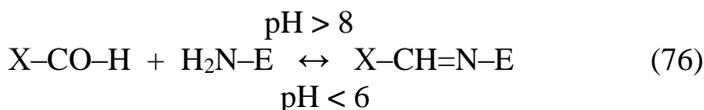


Что касается аминокрупп, то их чаще всего ацилируют и/или алкилируют. В качестве ацилирующих агентов используют хлорангидриды и ангидриды жирных кислот (соответствующие производные дикарбоновых кислот выступают как сшивающие агенты), можно взять активированные эфиры, например, нитрофениловые эфиры карбоновых кислот. В последнем случае за реакцией (степенью модификации аминокрупп) легко количественно следить спектрофотометрически по выделяющемуся нитрофенолятиону ($\lambda = 400$ нм):



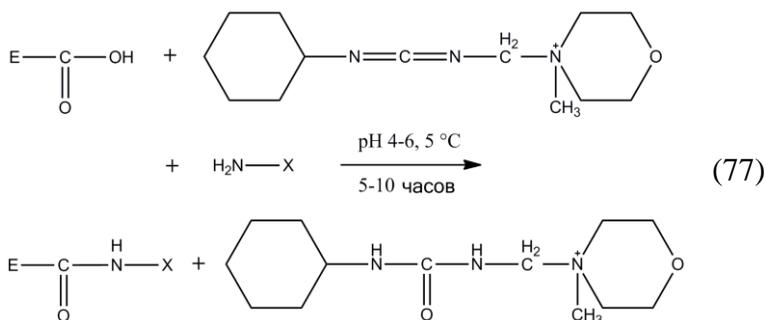
где X –сшивающий агент и/или носитель, E – фермент.

Очень важной реакцией, в которой участвует амино-группа является реакция образования основания Шиффа с альдегидами и кетонами:

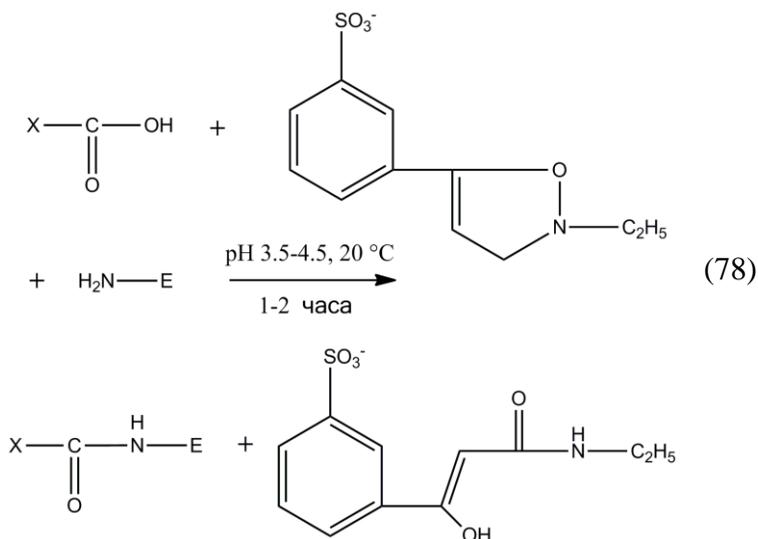


Образовавшуюся азометиновую группировку можно восстановить в мягких условиях (боргидридом или цианборгидридом натрия) до вторичного амина и, таким образом, сделать модификацию необратимой. Эта реакция относительно удобна и легко протекает, обычно при ее использовании не наблюдается существенная потеря ферментативной активности. Эту реакцию особенно стоит иметь в виду, когда целевой фермент гликозилирован – в этом случае углеводный фрагмент может быть легко окислен периодатом до альдегидных групп, к которым и присоединяется аминированный сшивающий агент и/или носитель с аминогруппами.

Карбоксильные группы белка (и/или носителя) вводит в реакцию, как правило, под действием конденсирующих агентов, например, карбодиимидов (77) и/или реактива Вудворда (78):



В приведенном выше примере в качестве карбодиимида использован широко распространенный именно для иммобилизации ферментов циклогексилморфолиноэтилкарбодиимид, водорастворимый реагент с водорастворимым продуктом (легко отмыть от препарата иммобилизованного фермента).



Преимущества и недостатки иммобилизованных ферментов

Неоспоримым преимуществом иммобилизованных ферментов является их технологичность. Иммобилизованные ферменты как правило более стабильны, их легко как вводить, так и извлекать из реакционных смесей.

К недостаткам следует отнести возможность (весьма частую) снижения каталитической активности и субстратной специфичности (так, например, иммобилизованные ферменты резко теряют активность по отношению к макромолекулярным субстратам). Системы с иммобилизованными ферментами, как правило, гетерогенны, они требуют

решения вопросов массопереноса (измельчения частиц, перемешивания и так далее).

Благодаря указанным преимуществам и несмотря на указанные выше недостатки иммобилизованные ферменты составили основу многих технологических процессов (катализаторы реакций химического синтеза, осветление соков и вин, створаживание молока, функционирование в аналитических устройствах и так далее).

Ферментативный катализ в химии

Ферменты, можно сказать, традиционно используются как катализаторы гидролиза биополимеров, в частности белков и полисахаридов. В свою очередь гидролизаты белков используют в медицине для парентерального и спортивного питания. В настоящее время немалое внимание уделяется также образующимся при протеолизе пептидам (в силу растущего к ним интереса как биорегуляторам). Гидролиз полисахаридов также традиционно проводили с участием ферментов. Например, удаление крахмала с тканей в текстильной промышленности проводили обработкой амилазой, ферментом, расщепляющим крахмал. Ферментативный гидролиз крахмала имеет и большое самостоятельное значение, поскольку основные продукты в этом процессе – глюкоза, а затем (после ферментации) – этанол, имеют значительную пищевую ценность и не только. Дегидратацией этанола относительно легко получить этилен, углеводородное сырье для многих технологически важных продуктов. Именно этим путем можно получить полиэтилен – перспективный материал для замены железных труб, подвергающихся постоянной коррозии, и нуждающихся в регулярной замене.

В настоящее время ассортимент углеводного сырья для ферментативного гидролиза существенно расширился. Здесь в первую очередь необходимо указать на целлюлозу

и целлюлозосодержащие продукты, в том числе отходы различных производств, в первую очередь лесоперерабатывающей промышленности и сельского хозяйства.

Важное место ферментативный катализ занимает в переработке таких важных природных продуктов как липиды (в первую очередь триглицериды – растительные масла и животные жиры). Во-первых, триглицериды можно подвергать полному гидролизу до глицерина и свободных жирных кислот. Все эти продукты находят применение в пищевой промышленности, в косметике и фармацевтическом производстве. Во-вторых, гидролиз может быть неполным, в качестве основных продуктов здесь укажем на моно- и диглицериды – широко используемые эмульгаторы (например, в пищевой промышленности). Наконец, в-третьих, одни триглицериды можно превращать в другие, из дешевых, типа пальмового масла, можно делать дорогие, такие как масло какао, путем переэтерификации, подбирая соответствующие ферменты и жирнокислотный состав триглицерида.

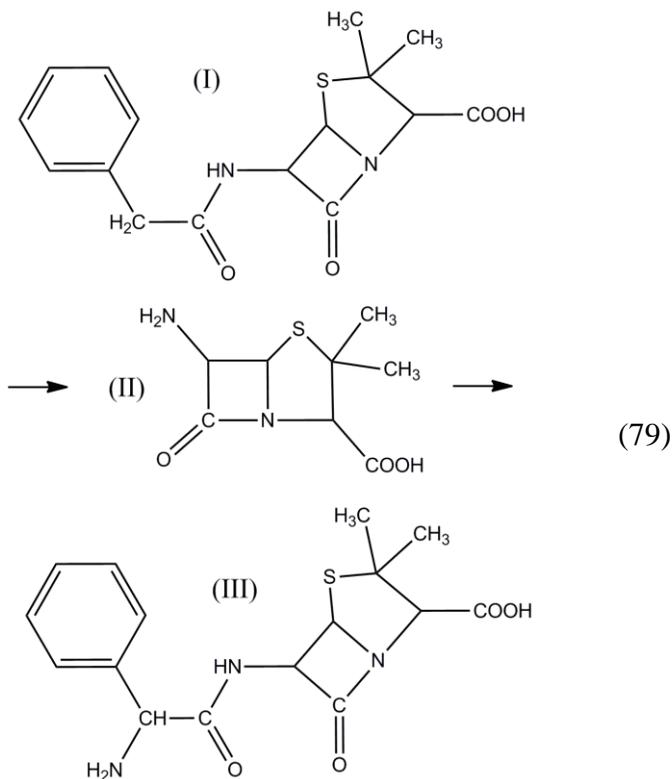
Активно ведутся работы по переработке природных растительных масел (пальмового, рапсового, подсолнечного) в альтернативное дизельное топливо. В этом плане получают триглицериды с более короткими жирными кислотами (для газонокосилок и лодочных моторов) и/или метиловые и этиловые эфиры длинноцепочечных жирных кислот (из масла). Говоря о моторном топливе в связи с перспективами израсходования нефти, невозобновляемого природного углеводородного сырья, отметим, что в мире достаточно активно проводятся работы по изучению и освоению природных систем синтеза углеводов, в частности микробных и растительных. В этой связи напомним, что немаловажным источником полиизопрена (латекса) являются так называемые каучуконосы, в частности гевея.

Но, безусловно, вне конкуренции в химической технологии процессы получения и переработки стереоизомеров - оптически активных соединений. В классическом химическом синтезе, например, аминокислот образуются рацематы – смеси L- и D-изомеров. Разделить эти смеси довольно-таки трудно, сделать это можно относительно легко с использованием ферментных технологий. Так, если проацилировать рацемат аминокислоты получим смесь ацил-L- и ацил-D-аминокислот. Действуя на эту смесь ферментом ацилазой получим смесь свободной L-аминокислоты и неизменившейся ацил-D-аминокислоты, такую смесь уже легко разделить, например, методом ионообменной хроматографии. Помимо аминокислот существует еще немало практически значимых оптически активных веществ. В этом плане обратим внимание на потребности химии стероидов, где при их трансформации успешно могут быть использованы и используются ферменты. Здесь также нелишним будет напоминание того, что ВОЗ не рекомендует использование рацематов в качестве лекарственных средств, а только индивидуальных изомеров.

Ферменты в химическом синтезе успешно можно использовать и тогда, когда требуется высокая субстратная специфичность. Так, например, один из самых известных антибиотиков, бензилпенициллин, заметно потерял к настоящему времени свою антибактериальную эффективность из-за роста антибиотикоустойчивости (резистентности) многих новых штаммов болезнетворных бактерий. Выход – в переходе к так называемым полусинтетическим антибиотикам, например, к ампициллину (III), получаемому на базе природного бензилпенициллина (I) (уравнение (79)).

В молекуле бензилпенициллина (I) две амидные связи, с боковым радикалом и в β -лактамном кольце. При щелочном гидролизе расщепляются обе, причем вторая легче.

Чтобы сохранить β -лактажное кольцо для гидролиза бензилпенициллина используют фермент пенициллинамидазу, который катализирует гидролиз только одной амидной связи между фенилуксусной и 6-аминопенициллановой кислотами. В результате такого гидролиза получается 6-амино-пенициллановая кислота (II), которая, в свою очередь, может быть проацилирована различными кислотами, в нашем случае аминофенилуксусной с образованием ампициллина (III). Подобным путем получают ряды различных новых антибиотиков, например, цефалоспорины.



Ферменты в аналитической химии (и медицинской диагностике)

В ферментативных системах в качестве аналита (определяемого вещества) могут выступать фермент, субстрат и/или ингибитор (эффектор). В основном здесь имеются в виду кинетические методы анализа, когда устанавливается связь наблюдаемой скорости ферментативной реакции и концентрации аналита (калибровочная кривая). Определение активности (концентрации) того или иного фермента часто требуется для диагностики заболеваний. Так, например, при повреждении сердечной мышцы (инфаркте миокарда) в крови резко возрастает содержание лактатдегидрогеназы, и этот факт, естественно, активно используется в клинической практике.

Помимо прямых методов анализа ферментов, ферменты могут быть использованы в качестве меток (маркеров) тех или иных структур (потенциальных аналитов). Наиболее успешным и широко распространенным в настоящее время является иммуноферментный анализ. В основе этого метода лежит взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса. Антитела вырабатываются в организме животных В-лимфоцитами и нацелены на удаление (или нейтрализацию действия) различных чужеродных веществ. Иными словами, практически на любое вещество (потенциальный аналит) можно получить (поликлональные) антитела, проиммунизовав подходящее животное (обычно кролика, морскую свинку, барана, осла или, если надо, верблюда). Используются также моноклональные антитела, полученные на базе гибридомной технологии.

Антитела высокоспецифичны к используемому антигену, константа образования иммунного комплекса составляет величины (10^{-8} – 10^{-10}) М, почти отсутствуют перекрестные реакции с аналогами антигена.

Чтобы визуализировать образование иммунокомплекса, либо антитело, либо антиген метят ферментом. Чаще всего в иммуноферментном анализе в качестве метки-фермента используют пероксидазу (из хрена или рекомбинантную), иногда также используют щелочную фосфатазу. В случае обеих ферментов существуют удобные каталитические реакции, приводящие к цветным продуктам. На практике используют различные схемы и приемы иммуноферментного анализа (ИФА). Мы здесь рассмотрим два наиболее распространенных, метод конкурентного ИФА и сэндвич-ИФА (см. Рис. 10.1). Сэндвич ИФА (схема 1 на Рис. 10.1) используют тогда, когда к антигену (аналиту) можно изготовить по крайней мере две разных популяции антител. Тогда одно из них иммобилизуют на носителе (обычно на используемой для анализа полистирольной плашке), добавляют исследуемый раствор и связавшиеся с антителами антигены визуализируют добавлением вторичных антител меченых ферментом. Количество образовавшегося в конечном итоге конъюгата определяют добавлением соответствующего субстрата, дающего окрашенный продукт. Чем больше в исследуемом растворе было анализируемого антигена, тем большее количество фермента оказалось вовлеченным в реакцию и привело к большему количеству продукта. Здесь, в сэндвич ИФА наблюдается прямая пропорциональность между концентрацией аналита и количеством продукта в стандартной процедуре анализа.

В конкурентном методе ИФА (схема 2 на Рис. 10.1) к иммобилизованным антителам добавляют смесь определяемого антигена с меченым антигеном. Количество связавшегося меченого антигена определяют, добавив хромогенный субстрат (аналогично заключительной процедуре в сэндвич ИФА). Однако, здесь в силу конкуренции за связывание меченых и немеченых антигенов, чем больше бы

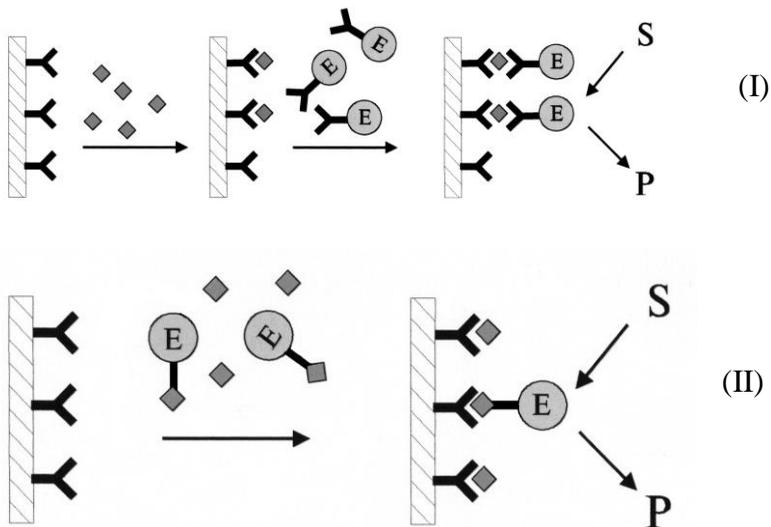


Рисунок 10.1. Схемы иммуноферментного анализа (ИФА): сэндвич ИФА (I), конкурентный ИФА (II).

ло определяемого аналита в исследуемой смеси, тем меньше обнаружится ферментной метки, то есть в отличие от сэндвич ИФА наблюдается обратная пропорциональность концентрации аналита и количество продукта ферментативной реакции в стандартной процедуре анализа.

В принципе на базе ферментов, антител, рецепторов и даже целых клеток можно конструировать различные биосенсоры, использующие в качестве детекторов электроды, полупроводники, оптические преобразователи, термисторы и пьезоэлементы. Нетрудно представить пьезорезонатор с иммобилизованным на нем антителом, дающий соответствующий электрический сигнал после образования иммунокомплекса.

Вообще говоря, в настоящее время электрохимические методы анализа (с использованием ферментных электро-

дов) оказываются хорошо развитыми и на профессиональном и на бытовом уровне. Так, определение глюкозы осуществляется в глюкометрах с помощью фермента глюкозооксидазы, иммобилизованной на электрод.

Помимо электрохимических методов все более широкую практику приобретают методы биOLUMИНИСЦЕНТНОГО анализа. К настоящему времени разработан ряд компактных и недорогих люминометров, которые без особых затруднений могут быть использованы в полевых условиях. В аналитических системах здесь обычно используют бактериальные и светляковые люциферазы. В последнем случае в качестве одного из субстратов фермент использует АТФ, что позволяет определять этот кофактор биOLUMИНИСЦЕНТНОЙ техникой на фемтомолярном уровне и создавать таким образом высокочувствительные методы выявления бактериального загрязнения, в частности пищевых продуктов и материалов медицинского назначения.

Ферменты в медицине (терапии)

В предыдущем разделе мы видели, что ферментные технологии активно внедрены и продолжают внедряться в медицинскую диагностику. Особенно здесь следует отметить успехи иммуноферментного анализа, на базе которого построены основные методы анализа гормонов, тиреоидных и стероидных, онкомаркеров, маркеров многих других серьезных патологий.

Говоря о ферментах в медицине нельзя не обратить внимание на тот факт, что основные (биохимические) механизмы регуляции завязаны на ферментах. В этой связи становится понятным, что большинство лекарственных препаратов по своей природе ингибиторами тех или иных ферментов. Так, например, хорошо известный лекарственный препарат понижающий кровяное давление, капотен, является ингибитором АПФ (ангиотензинпревращающего

фермента). Ряд препаратов, назначаемых для понижения уровня глюкозы в крови (например, янувия) являются ингибиторами дипептидилпептидазы, в свою очередь регулирующей уровень инкретиннов, гликогенолиза и синтеза инсулина β -клетками поджелудочной железы.

Большинство нестероидных противовоспалительных препаратов, включая салицилаты, например, аспирин, производные пропионовой кислоты, например, ибупрофен, производные фенилуксусной кислоты, например, диклофенак, это все ингибиторы простагландинсинтетазы (циклооксигеназы). Поскольку этот фермент участвует и в синтезе тромбосанов то указанные выше препараты, особенно аспирин, как необратимый ингибитор, используются профилактически для подавления процессов тромбообразования (а, по-простому, для профилактики инфарктов и инсультов).

Естественно, поиск новых эффективных лекарственных средств – ингибиторов ферментов базируется на данных лабораторных исследований соответствующих ферментных систем.

Собственно, ферменты как лекарства уже относительно давно используются в качестве наружных средств и мазей, для лечения некрозов, ран, пролежней и так далее (например, препарат ируксол на базе бактериальной коллагеназы).

В заместительной терапии, главным образом для улучшения пищеварения используют пероральные препараты на основе гидролитических ферментов – протеаз, липаз и амилазы, как животного (панкреатин), так и растительного происхождения (папаин, бромелаин). На фармацевтическом рынке таких препаратов достаточно много и их число постоянно растет. Здесь помимо классического панкреатина, в настоящее время можно найти такие как креон, пензитал, панзинорм, мезим, фестал (как правило

различия в составе оболочки и добавках), а также вобэнзим и флогэнзим (с растительными ферментами и витаминными добавками).

Ферменты также могут быть использованы во внешних шунтах, например, уреазы, в системах очистки крови.

Однако, особые требования предъявляются к фармацевтическим препаратам и веществам в том числе и ферментам, вводимым в кровь (парэнтерального назначения). Они, само собой разумеется, должны быть стерильны, апирогенны, нетоксичны и не аллергены, не иметь побочных эффектов, не нарушать гомеостаз и структуру клеток крови. Ферментные препараты этого типа являются средствами этиотропной терапии и являются тромболитиками, в первую очередь на основе активаторов плазминогена, таких как стрептокиназа и урокиназа. Так как стрептокиназа характеризуется аллергенностью (иммуногенностью) на базе этого фермента создан и внедрен в медицинскую практику препарат **стрептодеказа** со стрептокинвазой иммобилизованной на декстране. Урокиназа изначально была выделена из мочи. Так как этот фермент продемонстрировал хорошие характеристики, в настоящее время получен генно-инженерный (рекомбинантный) фермент, а на его основе препарат **пуролаза**, используемый в медицинской практике.

На мой взгляд большой потенциал имеют ферменты медицинской пиявки, поскольку они лизируют не только свежесформированные фибриновые сгустки (тромбы), но и застарелые, расщепляя по-видимому изопептидные связи в белках.

Наконец, яркий пример ферментной этиотропной терапии дает использование бактериофагов и препаратов ассоциированных с фагами ферментов (из фаголизатов) в лечении инфекционных заболеваний. В связи с повышением антибиотикорезистентности многих штаммов патогенных

микробов противомикробные препараты на основе ферментов представляются исключительно перспективными и альтернативными антибиотикотерапии.

Рекомендуемая литература

Б. Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин «Основы молекулярной биологии клетки» М.: Лаборатория знаний, 2018

Д. Нельсон, М. Кокс «Основы биохимии Ленинджера» в 3 томах. М.: Бином, 2008-2011

Я. Кольман, К.-Г. Рем «Наглядная биохимия» М.: Мир, 2009

А.М. Копылов, А.В. Бачева «Краткий словарь избранных терминов по химической биологии» М.: Химфак МГУ, 2011

A.L.Leninger, D.L.Nelson, M.M.Cox "Principles of Biochemistry", Worth Publishers, Inc.: N.Y., 1993

И.В.Березин, К.Мартинек "Основы физической химии ферментативного катализа", М.: Высшая Школа, 1977

Г.Шульц, Р.Ширмер "Принципы структурной организации белков" М.: Мир, 1982

Э.Фёршт "Структура и механизм действия ферментов", М.: Мир, 1980

С.Д.Варфоломеев "Химическая энзимология", М.: Академия, 2004

И.В.Березин, Н.Л.Клячко, А.В.Левашов и др. "Иммобилизованные ферменты" (Биотехнология. Кн.7), М.: Высшая Школа, 1987.

Е.В.Румянцев, Е.В.Антина, Ю.В.Чистяков "Химические основы жизни", М.: Химия, 2007.

Автор (Андрей Вадимович Левашов) выражает глубокую признательность Павлу Андреевичу Левашову за квалифицированную помощь в подготовке рукописи и изготовлении иллюстраций.