

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего професси-
онального образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Л.В. Тимощенко

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

*Издание 2-е,
переработанное и дополненное*

Издательство
Томского политехнического университета
Томск 2013

УДК 577
ББК 24.23я73
С208

Тимощенко Л.В.

С208 Основы молекулярной биологии/ Л. В. Тимощенко; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2013. –206 с.

В учебном пособии в доступной форме изложены избранные главы современной биологической химии. Значительное внимание уделено химическим свойствам основных биологических мономеров и полимеров. Пособие предназначено для студентов и магистрантов направления «Биотехнология».

УДК 547 + 547.1'121(076)
ББК 24.23я73

Рецензенты

Зав. кафедрой химии Сибирского медицинского университета,
профессор, доктор химических наук
М. С. Юсубов

Профессор Томского государственного университета, доктор химических наук
А. Г. Филимошкин

© ФГБОУ ВПО НИ ТПУ «Томский политехнический университет», 2013
© Тимощенко Л.В., 2013
© Оформление. Издательство Томского Политехнического университета, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. Место биохимии среди других биологических наук. Основные этапы развития биохимии -----	6
РАЗДЕЛ 1. БЕЛКИ -----	9
Строение, свойства и функции белков -----	9
Пептидный остов белков -----	10
Структура и свойства аминокислот -----	11
Классификация аминокислот -----	13
Кислотно-основные свойства аминокислот -----	14
Структура белков -----	15
Первичная структура белков -----	16
Конформация пептидных цепей в белках -----	17
Вторичная структура белков -----	18
Третичная структура белков -----	20
Денатурация белков -----	21
Простые и сложные белки -----	22
Четвертичная структура белков -----	23
Комплементарность протомеров -----	23
Биологические функции белков -----	24
Взаимодействие с лигандами -----	25
Ингибиторы функций белков -----	25
Выделение индивидуальных белков -----	27
РАЗДЕЛ 2. ФЕРМЕНТЫ -----	30
Краткая история учения о ферментах -----	30
Понятие о катализе -----	31
Отличие ферментов от других видов катализаторов -----	32
Специфичность действия ферментов -----	34

Кофакторы ферментов -----	36
Металлозависимые ферменты -----	36
Коферменты -----	36
Классификация и номенклатура ферментов-----	45
Основы кинетики ферментативных реакций.-----	46
Уравнение Михаэлиса-Ментен -----	46
Единицы ферментативной активности -----	49
Ингибиторы ферментов-----	50
Распределение ферментов в организме -----	51
Применение ферментов в медицине -----	52
РАЗДЕЛ 3. УГЛЕВОДЫ-----	54
Классификация углеводов-----	55
Моносахариды-----	55
Стереоизомерия-----	56
Циклические формы -----	57
Формулы Хеуорса -----	59
Таутомерия моносахаридов -----	60
Производные моносахаридов и их химические свойства -----	62
Дисахариды -----	68
Восстанавливающие дисахариды -----	69
Невосстанавливающие дисахариды -----	70
Биозные фрагменты природных гликозидов. -----	71
Аминогликозиды-антибиотики -----	71
Полисахариды (гликаны)-----	72
Гомополисахариды -----	72
Гетерополисахариды -----	74
РАЗДЕЛ 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ -----	76
Структурные элементы нуклеиновых кислот-----	76
Первичная структура нуклеиновых кислот -----	80

Вторичная структура ДНК -----	82
Вторичная структура РНК -----	84
Биосинтез нуклеиновых кислот и белков -----	85
(матричные биосинтезы) -----	85
Репликация ДНК-----	86
Биосинтез РНК (транскрипция) -----	87
Биосинтез белка (трансляция) -----	87
Адапторная функция т-РНК-----	89
Роль матричной РНК-----	91
РАЗДЕЛ 6. ЛИПИДЫ-----	93
Омыляемые липиды -----	93
Простые липиды-----	94
Сложные липиды -----	96
Неомыляемые липиды -----	99
Терпены -----	99
Стероиды-----	102
Простагландины и тромбоксаны -----	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ -----	107

ВВЕДЕНИЕ

Место биохимии среди других биологических наук. Основные этапы развития биохимии

Биологическая химия изучает молекулярные процессы, лежащие в основе развития и функционирования организмов. Биохимия использует методы “молекулярных” наук – химии, физической химии, молекулярной физики, и в этом отношении биохимия сама является молекулярной наукой. Однако главные конечные задачи биохимии лежат в области биологии: она изучает закономерности биологической, а не химической формы движения материи. С другой стороны, “молекулярные изобретения” природы, открываемые биохимиками, находят применение в небиологических отраслях знания в промышленности (молекулярная бионика, биотехнология). В таких случаях биохимия выступает в роли метода, а предметом исследований и разработок являются проблемы, выходящие за пределы биологии.

Первоначальные этапы истории биохимии совпадают с историей органической химии. До середины 19 века органической химией называли науку, которая изучала вещества, входящие в состав животных и растительных организмов, т.е. вещества живого “органического” мира. Позднее, в связи с развитием синтетической химии соединений углерода, смысл термина “органическая химия” изменился – так теперь называют химию соединений углерода, а науку, изучающую химический состав живых организмов и химические процессы, протекающие в них, стали называть физиологической, а затем биологической химией. Биологическая химия изучает не только органические, но и неорганические соединения, содержащиеся в организмах. Разумеется, и после этой дифференциации органической и биологической химии их развитие происходит в тесном взаимодействии, объединяемое множеством общих методов и общих задач.

Историю биохимии (и органической химии) принято отсчитывать с конца 18 века, когда впервые были выделены из организмов в чистом виде некоторые соединения – мочевины, лимонная кислота, яблочная кислота и др. В то время еще не было представлений о строении этих веществ. Длительный период развития биохимии – вплоть до середины 20 века – заполнен открытием все новых веществ в живой природе, исследованием их структуры и химических превращений в организмах.

Важнейшими достижениями этого периода явились установление общего плана строения главных биополимеров – белков и нуклеиновых кислот и основных путей химических превращений веществ в организмах (метаболизм). В этот же период произошла дальнейшая дифференциация биохимии: в ней стали выделять *статическую биохимию*, изучающую химический состав организмов, *динамическую биохимию*, изучающую метаболизм, *функциональную биохимию*, изучающую связь химических процессов с физиологическими функциями.

Середина нашего столетия явилась переломным этапом в истории биохимии. Развитие молекулярного уровня исследований за последние 30–40 лет привело к перестройке структуры не только биохимии, но и всей биологии – ее методов, эмпирической основы, теоретических элементов, форм практического использования, классификации разделов биологии.

Отличительной чертой этого периода является переход к широкому изучению структуры и свойств индивидуальных представителей белков и нуклеиновых кислот, к выяснению функции каждого индивидуального белка и нуклеиновой кислоты в живой клетке. Предпосылкой для этого послужило стремительное развитие методов разделения веществ и изучения их структуры, а также специфических для биохимии методов выделения и исследования надмолекулярных структур – клеточных органелл. Если в предшествующий период функциональная биохимия только зарождалась, то теперь она становится ведущим направлением в биохимии. По-прежнему сохраняются и усиливаются связи с органической химией, но одновременно резко возрастает значение связей биохимии с другими биологическими науками – цитологией, физиологией, генетикой. Наиболее ярким выражением этого явилось раскрытие молекулярных механизмов таких фундаментальных свойств жизни, как наследственность и изменчивость.

В 50–60-х годах нашего века, когда была установлена структура ДНК, позволившая объяснить механизм репликации генов, возникло новое название для обозначения этого направления исследований – *молекулярная биология*. Первоначально молекулярной биологией называли область биохимии, изучающую молекулярные основы общебиологических явлений – наследственности, изменчивости, биологической эволюции. Однако очень скоро значение термина изменилось, и его стали применять в более широком смысле, вплоть до того, что некоторые биохимики считают термины “молекулярная биология” и “биохимия” синонимами.

До середины 20 века в биохимии преобладало исследование химических превращений веществ в организме, сопровождающихся изме-

нением структуры соединений (метаболизм). Однако со временем выяснилось, что не меньшее значение в обмене веществ и функционировании организма имеют физико-химические процессы, не связанные с изменением структуры соединений. Область биохимии, изучающую физико-химические и молекулярно-физические основы жизнедеятельности называют **физико-химической биологией**. Всякое изменение молекул в организме можно изучать в двух направлениях. Одно из них – выяснение роли этого процесса для функционирования живой клетки, органа, организма. Другое же – выяснение химических и физических основ этого процесса, т.е. объяснение поведения молекул в организме, исходя из законов химической и физической форм движения материи. Исследованием этого процесса занимается **биоорганическая химия**. Биоорганическая химия занимает положение, пограничное с органической химией, но в отличие от нее изучает прежде всего те свойства соединения, которые непосредственно связаны с его функцией в организме. Кроме того, биоорганическая химия разрабатывает принципы создания синтетических биологически активных соединений, т.е. веществ, определенным образом изменяющих функции организма (лекарства, избирательно действующие инсектициды и др.).

Вот, пожалуй, и все основные направления биохимии, имеющие общебиологическое значение. Кроме этих направлений существуют другие, более мелкие направления, касающиеся, например, биохимии вирусов, растений и др.

Таким образом, биохимия в целом изучает химические и физико-химические процессы, результатом которых являются развитие и функционирование живых систем всех уровней организации. Как видим, современная биохимия представляет собой разветвленную область знаний, разделы которой тесно связаны друг с другом и не могут быть четко разграничены.

Раздел 1. БЕЛКИ

Строение, свойства и функции белков

Представление о белках как о классе соединений сформировалось в 18–19 веках. В этот период из разнообразных объектов живого мира (семена и соки растений, мышцы, хрусталик глаза, кровь, молоко и т.п.) были выделены вещества, обладающие сходными свойствами: они образовывали вязкие, клейкие растворы, свертывались при нагревании, при их высушивании получалась роговидная масса, при сжигании ощущался запах паленой шерсти и выделялся аммиак. Поскольку все эти свойства ранее были известны для яичного белка, то новый класс веществ получил название белки.

В начале 19 века появились более совершенные методы элементного анализа веществ и начались исследования элементного анализа белков. В них обнаружили углерод, водород, азот, кислород, серу и фосфор. Голландский химик и врач Мульдер Г.Я. (1802–1880) предложил первую теорию строения белков. Исходя из исследований элементного состава, Мульдер пришел к выводу, что все белки содержат одну или несколько групп $C_{40}H_{62}N_{10}O_2$, соединенных с серой, или фосфором, или тем и другим вместе. Он предложил для обозначения этой группы термин “протеин” (от греческого – первый), т.к. считал, что это вещество “важнейшее из всех известных тел органического царства, и без него не может быть жизни на нашей планете”. Представление о существовании такой группы скоро было опровергнуто, а значение термина “протеины” изменилось, и сейчас применяется как синоним термина “белки”.

Важную роль в установлении структуры белков сыграло развитие методов их разложения кислотами и пищеварительными соками. В 1820 году А. Браконно (Франция) подвергал многочасовому действию серной кислоты кожу и другие ткани животных, затем нейтрализовал смесь, получал фильтрат, при выпаривании которого выпадали кристаллы вещества, названного им гликоколом (клеевым сахаром). Это была первая аминокислота, выделенная из белков. Ее структурная формула установлена в 1846 году.

К концу 19 века из белков было выделено свыше 10 аминокислот. Исходя из результатов изучения продуктов гидролиза белков, немецкий химик Э. Фишер предположил, что белки построены из аминокислот. Это положение послужило основанием для его многолетних исследований химии аминокислот и белков, завершившихся созданием в начале

20 века *пептидной теории строения белков*. В результате работ Фишера стало ясно, что белки представляют собой линейные полимеры α -аминокислот, соединенных между собой пептидной связью, а все многообразие представителей этого класса соединений могло быть объяснено различиями аминокислотного состава и порядка чередования разных аминокислот в цепи полимера. Однако эта точка зрения не сразу получила всеобщее признание: еще в течение 3 десятилетий появлялись другие теории строения белков, например, основанные на представлении, что аминокислоты не являются структурными элементами белков, а образуются как вторичные продукты при разложении белков под действием кислот и щелочей.

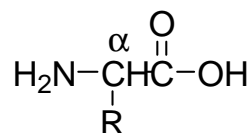
Первые исследования белков проводились со сложными белковыми смесями: яичный белок, сыворотка крови и др. Лишь в конце 19 века получили методы разделения белков с помощью осаждения нейтральными солями. В 30-е годы 20 века были получены первые белки в кристаллическом состоянии. Получение вещества в кристаллическом виде служит одним из надежных доказательств чистоты препарата. Так, Д. Нортроп и М. Куитц в 1930–1931 году получили кристаллы пепсина и трипсина. После этих пионерских работ выделение индивидуальных белков стало частым событием в истории биохимии, особенно в период после 50-х годов, когда начали применять современные методы фракционирования – хроматографию, гель-фильтрацию, электрофорез и т.д. Количество индивидуальных белков, известных к настоящему времени составляет около нескольких тысяч.

На современном этапе изучения белков основными направлениями являются следующие:

- изучение пространственной структуры индивидуальных белков;
- изучение биологических функций разных белков;
- изучение механизмов функционирования индивидуальных белков (на уровне отдельных атомов и атомных групп молекулы белка).

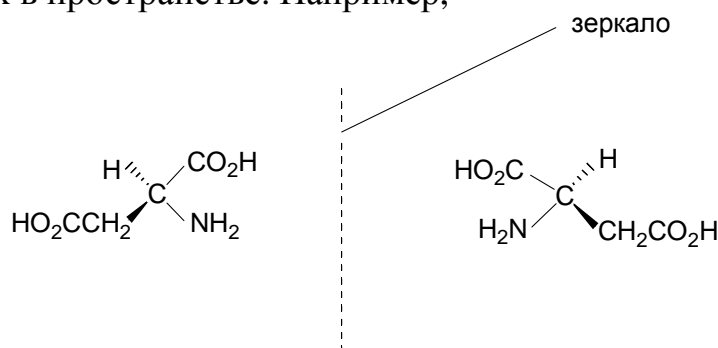
Пептидный остов белков

Мономерами белков служат α -аминокислоты, т.е. органические кислоты, у которых водород α -углеродного атома замещен аминогруппой – NH_2 . Общая формула аминокислот следующая:

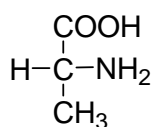


Структура и свойства аминокислот

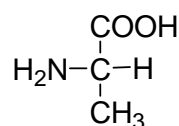
Если у α -углеродного атома все валентности замещены различными функциональными группами (R – радикал не повторяет имеющиеся группы), то такой C-атом называется *асимметрическим* или *хиральным*, а молекулы, содержащие асимметрический атом, называют *хиральными*. Термин “хиральность” обозначает, что два предмета представляют собой зеркальные отображения, не совпадающие при попытке совместить их в пространстве. Например,



Наиболее важным следствием хиральности молекулы является существование их в виде пары пространственных изомеров – энантиомеров. Все аминокислоты, за исключением глицина, имеют хиральный α -углеродный атом, и поэтому они могут встречаться в виде энантиомеров L и D. Если записать проекцию Фишера аминокислоты таким образом, что карбоксильная группа находится сверху, радикал – снизу, то у L-аминокислоты аминогруппа будет находиться слева, а у D-аминокислоты – справа. Например, в природе существуют два стереоизомера аланина:



D-аланин



L-аланин

Как L-, так и D-аминокислоты могут вращать плоскость поляризованного света как влево, так и вправо, т.е. быть левовращающими (–) и правовращающими (+) в зависимости от природы радикала, т.к. L и D

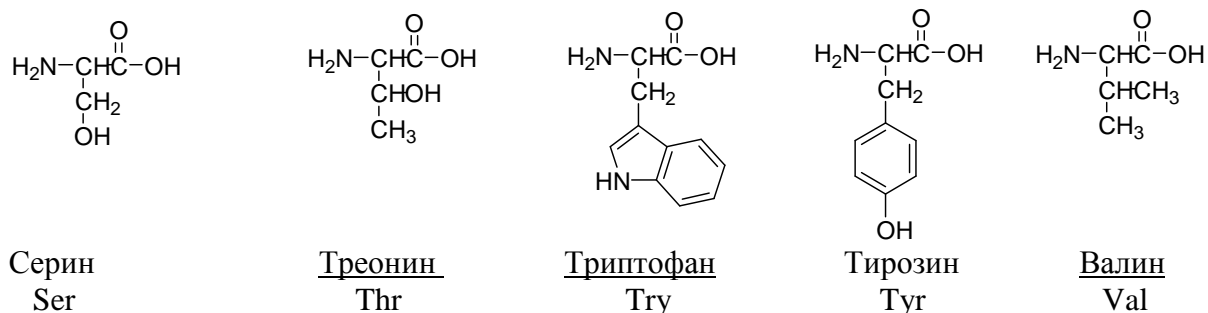
относятся к конфигурации α -углеродного атома, а оптическое вращение есть свойство молекулы в целом.

Вещества, содержащие два стереоизомера, называют *рацематами*, и обозначаются как D,L-вещества.

Все природные аминокислоты, встречающиеся в белках, относятся к L-ряду. Всего белковых аминокислот известно 20, из них 10 аминокислот являются *незаменимыми*, и эти аминокислоты должны содержаться в пище обязательно, т.к. они не могут синтезироваться в организме из других веществ.

Таблица 1.1. Аминокислоты, встречающиеся в живых системах*

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
Аланин Ala	Аргинин Arg	Аспарагин Asn	Аспарагиновая кислота Asp	Цистеин Cys
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{CH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Глутаминовая кислота Glu	Глутамин Gln	Глицин Gly	Гистидин His	<u>Изолейцин</u> Ile
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_8 \end{array}$
<u>Лейцин</u> Leu	<u>Лизин</u> Lys	<u>Метионин</u> Met	<u>Фенилаланин</u> Phe	Пролин Pro



* – незаменимые аминокислоты подчеркнуты

Классификация аминокислот

Все аминокислоты по структуре подразделяются на ациклические и циклические.

Ациклические аминокислоты по количеству аминных или карбоксильных групп делятся на:

1) моноаминомонокарбоновые аминокислоты, имеющие в своем составе одну аминную и одну карбоксильную группу; в водном растворе они нейтральны. К ним относятся (см. табл. 1.1): L-глицин (аминоуксусная кислота), L-аланин (аминопропионовая кислота), L-серин (α -амино- β -оксипропионовая кислота), L-треонин (α -амино- β -оксимасляная кислота), L-цистеин (α -амино- β -тиопропионовая кислота), L-метионин (α -амино- γ -тиометилмасляная кислота);

2) моноаминодикарбоновые кислоты, имеющие в своем составе одну аминную и две карбоксильные группы, их водный раствор имеет кислую реакцию. К ним относятся L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая кислота), L-аспарагиновая кислота (α -аминоянтарная кислота);

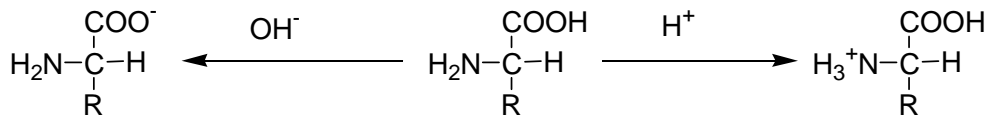
3) диаминомонокарбоновые аминокислоты, в которых на одну карбоксильную группу приходится две аминные, их реакция в водном растворе – щелочная (например, L-лизин (α, ϵ -диаминокапроновая кислота)).

Циклические аминокислоты (табл. 1.1) имеют в своем составе ароматическое или гетероциклическое кольцо. Например, L-фенилаланин (α -амино- β -фенилпропионовая кислота), L-триптофан (α -амино- β -индолилпропионовая кислота) и др.

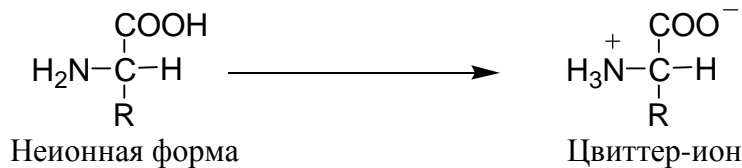
Для названия аминокислот удобнее пользоваться номенклатурой ИУРАС, т.к. она точно отражает строение каждой аминокислоты, однако тривиальные названия аминокислот уже прочно вошли в обиход органической химии, и еще важнее – биохимии.

Кислотно-основные свойства аминокислот

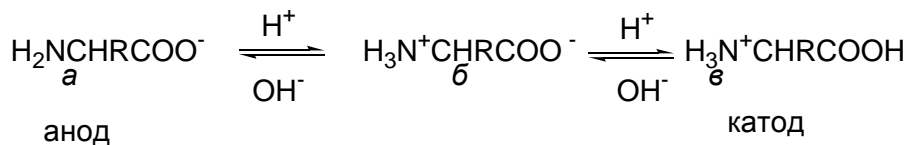
Аминокислоты – это амфотерные вещества, которые могут существовать в виде катионов или анионов. Это свойство объясняется наличием как кислотной (–COOH), так и основной (–NH₂) группы в одной и той же молекуле. В очень кислых растворах аминогруппа аминокислоты протонируется, и эта кислота становится катионом. В сильнощелочных растворах карбоксильная группа аминокислоты депротонируется и кислота превращается в анион:



В твердом состоянии аминокислоты существуют в виде **цвиттер-ионов** (иначе, диполярных ионов). В подобных цвиттер-ионах протон переносится от карбоксильной группы к аминогруппе:



Если поместить аминокислоту в среду, обладающую проводимостью и опустить туда пару электродов, то в кислых растворах аминокислота будет мигрировать к катоду, а в щелочных – к аноду, т.к. в сильнокислом растворе имеется значительный избыток катионов (*в*), а в щелочном – избыток анионов (*а*):

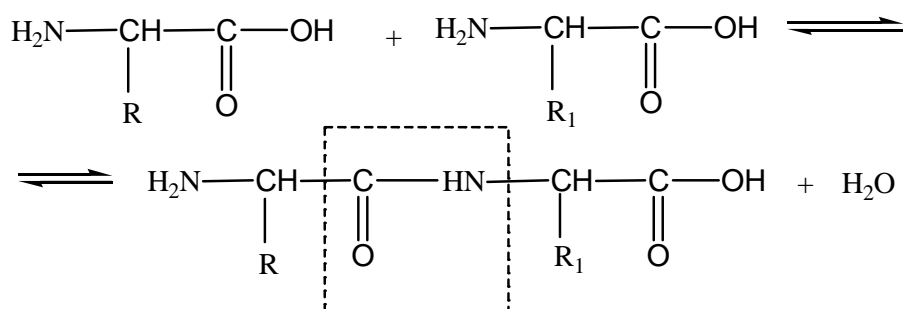


При некотором значении рН, характерном для данной аминокислоты, она не будет передвигаться ни к катоду, ни к аноду, т.к. каждая молекула будет находиться в виде цвиттер-иона (другими словами, она несет как положительный, так и отрицательный заряды). Это значение рН называется **изоэлектрической точкой pI**.

Значение изоэлектрической точки для каждой аминокислоты можно найти в таблицах.

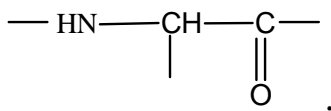
Структура белков

Белки построены из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидной связью, которая образуется между α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты:

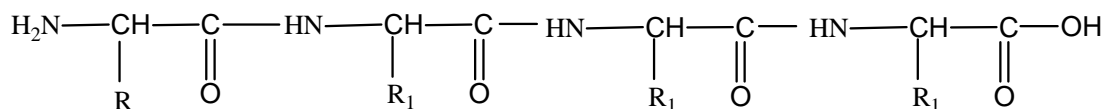


Соответственно соединения, в которых аминокислоты соединены пептидными связями, называют пептидами (дипептиды, олигопептиды, полипептиды). Образование пептидной связи можно представить как отщепление воды от взаимодействующих карбоксильной группы и аминогруппы.

В молекулах белков многократно повторяется группа



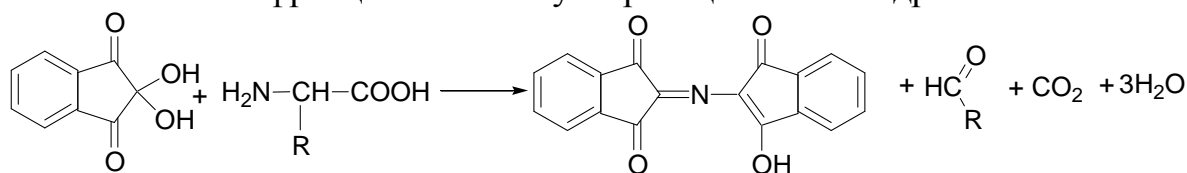
образуя остов пептидной цепи:



Этот пептидный остов – структура, свойственная всем белкам. В каждом белке (или полипептиде) один из двух концевых аминокислотных остатков имеет свободную аминогруппу (N-концевая АМК), а другой – свободную карбоксильную группу (С-концевая АМК). Структуру пептидов принято изображать, начиная с N-концевой АМК. Длина пептидной цепи в белках составляет от 20 до сотен и тысяч аминокислотных остатков.

Даже при одинаковой длине цепи белки являются разными, если отличаются по аминокислотному составу. Для определения аминокислотного состава белки подвергают гидролизу: его проводят в запаянной ампуле в соляной кислоте при 105°C в течение суток. Затем аминокисло-

ты гидролизата разделяют методом хроматографии на ионнообменных смолах, выделяя отдельно каждую аминокислоту. Для обнаружения аминокислот во фракциях используют реакцию с нингидрином:



В этой реакции бесцветный нингидрин превращается в продукт красно-фиолетового цвета. Измерив интенсивность окрашивания, можно рассчитать концентрацию каждой аминокислоты и число остатков каждой из аминокислот в исследуемом белке. В настоящее время такой анализ проводят с помощью приборов – аминокислотных анализаторов.

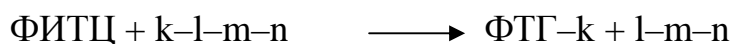
Первичная структура белков

Первичной структурой называют порядок чередования (последовательность) аминокислотных остатков в белке. Даже идентичные по длине и аминокислотному составу пептиды могут быть разными веществами. Например, из двух аминокислот – аланина и тирозина – можно построить 2 дипептида Ala-Тур и Тур-Ala. Из трех разных аминокислот можно получить 6 различных по структуре трипептидов. При n=20 число возможных изомеров равно $2 \cdot 10^{18}$, если учесть, что в составе пептидной цепи каждая аминокислота может встречаться больше одного раза, то число изомеров становится невообразимым. Однако в живой природе реализуются не все возможности. В организме человека имеется приблизительно около 100 тыс. разных белков.

Первичную структуру белка можно выяснить с помощью фенилтиогидаптоинового метода. Он основан на реакции фенилизотиоцианата (ФИТЦ) с α-аминокислотами, в которой образуются фенилтиогидаптоины аминокислот (ФТГ-аминокислоты):



Фенилизотиоцианат реагирует не только со свободными аминокислотами, но и с N-концевой аминокислотой пептидов, отщепляя ее от пептида. Если, например, анализируют тетрапептид **k-l-m-n**, то реакция проходит следующим образом:



После реакции выделяют ФТГ-k и идентифицируют его; допустим, он оказался фенилтиогидантоином глицина. Теперь можно записать последовательность исследуемого тетрапептида так: Gly-l-m-n. Затем таким же образом исследуют оставшийся трипептид и узнают второй аминокислотный остаток и т.д. Созданы автоматические приборы – секвенаторы, позволяющие с использованием этой реакции изучать первичную структуру пептидов, длиной до нескольких десятков аминокислотных остатков. Более крупные белки сначала фрагментируют, изучают структуру отдельных фрагментов, а затем выясняют последовательность фрагментов в исходной белковой молекуле. Не следует думать, что эти исследования столь же просты, как их принцип: изучение первичной структуры белка среднего размера занимает несколько месяцев.

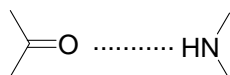
Конформация пептидных цепей в белках

Пептидная цепь обладает значительной гибкостью. В результате внутрицепочечных взаимодействий она приобретает определенную пространственную структуру (конформацию). Основным методом изучения трехмерной структуры является рентгеноструктурный анализ. Он основан на дифракции и интерференции рентгеновских лучей, проходящих через кристалл изучаемого вещества. Молекулы и атомы, входящие в эти молекулы, в кристалле занимают фиксированное положение. Рентгеновские лучи при прохождении через кристалл поглощаются электронами, которые сами становятся вторичными излучателями. Вторичные лучи испускаются равномерно по всем направлениям, но в некоторых направлениях происходит их усиление в результате интерференции. На фотопленке, помещенной за кристаллом, после проявления обнаруживается засвеченное пятно, вокруг которого в определенном порядке располагается много других засвеченных пятен разной интенсивности, которые и определяют расположение атомов в анализируемом кристалле.

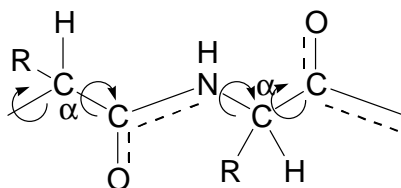
В белках различают два уровня конформации пептидных цепей – вторичную и третичную структуры.

Вторичная структура белков

Вторичная структура белков обусловлена свойствами пептидного остова. Карбонильная группа и NH-группа способны образовывать водородную связь между собой:



Минимуму свободной энергии соответствует такое состояние пептида, когда все эти группы связаны водородной связью. Иначе говоря, пептид стремится принять конформацию с максимумом водородных связей. С другой стороны, возможности пространственной укладки пептидной цепи ограничиваются тем, что пептидная связь имеет частично двойной характер, и поэтому вращение вокруг нее невозможно. Атомы кислорода и водорода пептидной группы занимают транс-положение. Напротив, вокруг обеих связей группы $-CH-$ пептидного остова возможно свободное вращение:



Вследствие этих ограничений при образовании водородных связей пептидная связь принимает не произвольную, а строго определенную конформацию.

Известны три основных типа вторичной структуры пептидных цепей: α -спираль, β -структура (складчатый слой, складчатый листок) и беспорядочный клубок. В α -спирали NH-группа данного остатка аминокислоты взаимодействует с CO-группой четвертого от него остатка. В результате пептидный остов образует спираль, на каждый виток которой приходится 3,6 аминокислотных остатка. Водородные связи ориентированы вдоль оси спирали, соединяя ее витки.

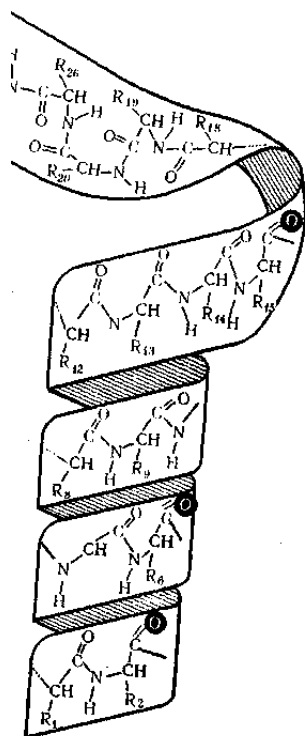


Рис. 1.1. Молекулярная модель полипептидной цепи, свернутой в α -спираль.

В складчатом слое (β -структура) пептидные связи располагаются параллельно друг другу в один слой, образуя фигуру, подобную листу, сложенному гармошкой. Слой может быть образован двумя или большим количеством пептидных цепей; смежные цепи в слое ориентированы N-концами в противоположные стороны (антипараллельно) или в одну сторону (параллельно).

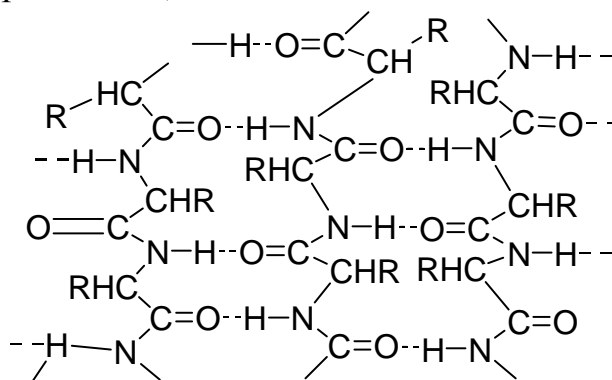


Рис. 1.2. Складчатый слой (β -структура)

Аминокислоты различаются по способности участвовать в образовании α -спиралей или β -структур: редко встречаются в составе α -

спиралей пролин, тирозин, глицин; в составе β -структур – глутаминовая кислота, лизин, серин.

Чаще всего, в белках встречаются участки, уложенные в спираль, в β -структуры, а некоторые участки не имеют правильной пространственной организации, их обозначают как беспорядочный клубок.

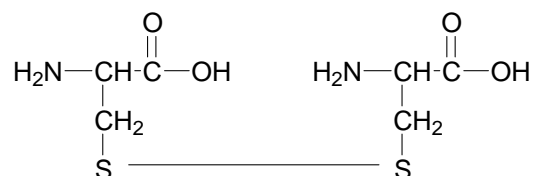
Третичная структура белков

По форме молекулы и особенностям пространственной структуры белки делятся на две группы – *глобулярные и фибриллярные*. Форма глобулярных белков близка к сферической, или эллипсоидной. Молекулы фибриллярных белков имеют удлинённую форму и могут образовывать многомолекулярные нитевидные агрегаты – фибриллы. Фибриллярные белки выполняют главным образом опорные функции, обеспечивая прочность тканей. Примером таких белков могут быть: коллаген – находится в сухожилиях (особенно много его образуется при ранах – на месте раны образуется разновидность соединительной ткани – рубец, основным компонентом которого является коллаген); эластин – особенно много его в тканях, испытывающих периодическое сокращение: кровеносные сосуды, легкие, некоторые связки, кератин – содержится в волосах, ногтях, рогах; миозин – в мускулах.

Глобулярные белки несравненно более разнообразны по функциям. К их числу относятся инсулин – находится в поджелудочной железе, гемоглобин – является переносчиком кислорода из легких к тканям, фибрин – вызывает свертываемость крови и др.

Третичная структура белков образуется путем дополнительного складывания пептидной цепи за счет взаимодействия между боковыми группами аминокислот. Основную роль в образовании третичной структуры играют слабые связи: водородные, ионные, гидрофобные и дисульфидные связи.

Дисульфидная связь возникает за счет тиоловых групп цистеина. Соединение, получающееся в результате замыкания дисульфидной связи называется *цистином*:



Образование дисульфидных связей приводит к тому, что удаленные друг от друга области пептида сближаются и фиксируются. Ди-

сульфидные связи имеются в очень многих, но не во всех белках: так, например, их нет в гемоглобине.

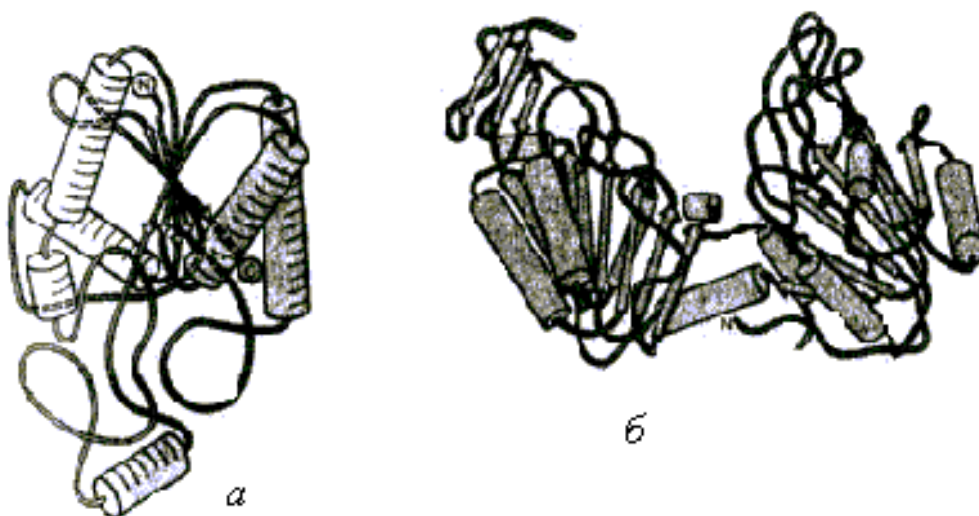


Рис. 1.3. Пространственная структура некоторых белков:
а – фосфоглицератмутаза, б – фосфоглицераткиназа

Денатурация белков

При разрыве большого числа связей, стабилизирующих пространственную структуру белковой молекулы, упорядоченная конформация пептидной цепи нарушается, и молекула целиком принимает форму беспорядочного клубка. Такое изменение белка называют *денатурацией*. Денатурацию можно вызвать нагреванием до 60–80°C или действием кислот, щелочей, рядом органических соединений – спиртов, фенолов, мочевины и др.

Денатурация обычно сопровождается снижением растворимости белка; при этом часто образуется осадок “свернувшегося белка”, а если концентрация белков в растворе достаточно велика, то “свертывается” вся масса раствора, как это происходит при варке куриного яйца. При денатурации утрачивается биологическая активность белков – на этом основано применение водного раствора фенола (карболки) в качестве антисептика. Явление денатурации свойственно лишь еще одному классу соединений – нуклеиновым кислотам.

Лабильность пространственной структуры белков и большая вероятность их денатурации при разнообразных воздействиях создает значительные затруднения при выделении и изучении белков, а также при использовании в медицине и промышленности.

Простые и сложные белки

Многие белки помимо пептидных цепей содержат компоненты не-аминокислотной природы – *простетическую группу*. Такие белки в отличие от простых, построенных только из аминокислот, называют сложными белками. (в литературе, особенно старой, сложные белки иногда называют протеидами – нуклеопротеиды, гликопротеиды и т.д.) Простетическая группа может быть представлена веществами разной природы.

Таблица 1.2. Некоторые сложные белки

Класс	Простетическая группа
Металлопротеины	Ионы металлов
Гемопро­теины	Гем
Глико­протеины	Моносахариды, олигосахариды
Муко­протеины	Мукополисахариды
Фосфо­протеины	H ₃ PO ₄

Фосфопротеины содержат фосфор. Наиболее важный представитель этой группы – казеин, содержащийся в молоке.

Металлопротеины – сложные белки, содержащие комплексно связанный металл (гемоглобин, содержит железо).

Гликопротеины и мукопротеины – соединения белков с углеводами – альбумины и глобулины сыворотки крови, гиалуроновая кислота стекловидной жидкости глаза.

Связи между пептидными цепями и простетической группой бывают как ковалентные, так и нековалентные. Например, фосфопротеины содержат фосфатные остатки, соединенные сложноэфирной связью с гидроксильными группами остатков серина или треонина – ковалентная связь. Простетическая группа гемоглобина – гем – соединена с белковой частью только нековалентными связями (координационная – между Fe и остатком гистидина).

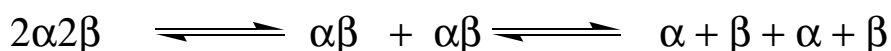
Сложный белок (холопротеин) может диссоциировать на белковую часть (апопротеин) и простетическую группу:



Часто равновесие этой реакции сильно смещено влево, особенно при наличии ковалентных связей между пептидом и простетической группой. В других случаях в равновесном состоянии могут преобладать продукты диссоциации холопротеина.

Четвертичная структура белков

Многие белки построены из двух или более пептидных цепей, соединенных нековалентными связями. Такие белки могут распадаться на составляющие их пептидные цепи при сравнительно небольших изменениях среды, например, при подкислении, подщелачивании, охлаждении и т.д. Примером может служить основной белок эритроцитов – гемоглобин (Hb). Он построен из четырех пептидных цепей – две цепи α и две цепи β . Строение тетрамерного Hb представляют формулой $2\alpha 2\beta$. При указанных выше воздействиях тетрамерный гемоглобин диссоциирует сначала на димеры, а затем и на мономеры (протомеры):



Димеры и протомеры называют субъединицами белка, протомеры – это наименьшие субъединицы. Если из раствора удалить агент, вызывающий диссоциацию, субъединицы вновь объединяются в тетрамерную молекулу, т.е. происходит самосборка молекул гемоглобина.

Белки, молекулы которых, подобно гемоглобину построены из нескольких полипептидных цепей (по существу, из нескольких белков меньшего размера), называют олигомерными белками. Количество протомеров, способ их соединения и пространственной укладки относительно друг друга называют *четвертичной структурой белка*.

Белки с молекулярной массой более 50000 почти всегда являются олигомерными. Число протомеров в олигомерных белках чаще всего лежит в пределах десяти, но может быть гораздо большим; наиболее часто встречаются димеры и тетрамеры. Протомеры могут быть как идентичными, так и разными.

Комплементарность протомеров

Протомеры соединяются в результате образования гидрофобных, ионных, водородных связей. При этом протомеры взаимодействуют друг с другом не любой частью своей поверхности, а определенным участком (контактная поверхность). Между каждой парой взаимодействующих контактных участков образуются десятки связей.

Процесс самосборки отличается высокой специфичностью. Если в растворе наряду с протомерами гемоглобина есть и другие белки, они не образуют соединений с протомерами гемоглобина. Протомеры данного белка “находят” и “узнают” друг друга, соединяясь только друг с другом. Взаимное узнавание протомеров обусловлено особой структурой

контактных поверхностей. При этом расположение групп, образующих связи, на одном протомере соответствует их расположению на другом протомере.

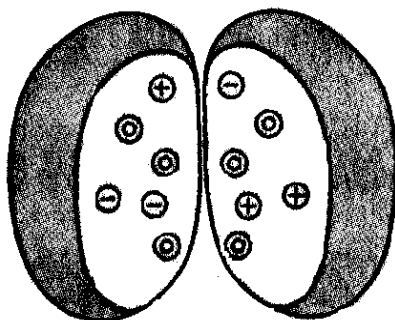


Рис. 1.4. Четвертичная структура гемоглобина: схема комплементарности контактных поверхностей протомеров

Если на одной поверхности имеется выступ, то на другой в соответствующем месте – углубление, в которое при контакте входит выступ; соответственно при контакте оказываются совпадающими разноименно заряженные ионные группы или группы, способные образовывать водородные связи. Такого рода поверхности называют **комплементарными**; они подходят друг к другу как ключ к замку. Каждый протомер взаимодействует с другим в десятках точек, это означает, что ошибочное соединение (например, с другими белками) практически невозможно.

Комплементарные взаимодействия молекул (не только белковых) лежат в основе всех биохимических процессов в организме.

Биологические функции белков

Белки выполняют в живой клетке наиболее разнообразные и наиболее интересные функции. Каждый белок имеет уникальную, свойственную лишь ему структуру, и в такой же мере уникальную функцию, отличающуюся от функций всех других белков. Некоторые белки можно объединить в группы по признаку сходства их функций:

1. Строительные (структурные) белки: белки соединительной ткани, фибрин тромбов, коллаген хрящей и сухожилий, эластин связок.
2. Каталитические белки (ферменты).
3. Транспортные белки: гемоглобин, сывороточный альбумин, трансферрин, белки трансмембранного транспорта.
4. Защитные белки (иммуноглобулины).

5. Сократительные белки. Все виды движения, к которому способны клетки, в том числе сокращение мышц, выполняют особые сократительные белки.

6. Резервные белки. Некоторые белки предназначены для питания плода или детеныша (овальбумин яйца, казеин молока). Другие белки используются организмом для расщепления до аминокислот и дальнейшего построения необходимого для организма белка, а часть подвергается глубокому расщеплению, в ходе которого высвобождается энергия.

7. Белки-регуляторы: белковые гормоны, белковые ингибиторы и активаторы ферментов и других белков.

Взаимодействие с лигандами

В основе функционирования любого белка лежит его способность к избирательному взаимодействию с каким-либо другим веществом – лигандом. Лигандом может быть как низкомолекулярное вещество, так и макромолекула, в том числе и другой белок. Лиганд присоединяется к определенному участку на поверхности белковой молекулы – центру связывания (активный центр). Специфичность взаимодействия (узнавания) чаще всего обеспечивается комплементарностью структуры центра связывания структуре лиганда, подобно тому, как это происходит при самосборке гемоглобина из протомеров.

Связи между белком и лигандом могут быть как ковалентными, так и нековалентными.

На молекуле белка могут быть один, два и более активных центров, имеющих одинаковую или разную специфичность. Например, каждый протимер гемоглобина имеет три центра для связывания с тремя другими протимерами и один центр для связывания гема. Тетрамерная молекула гемоглобина имеет четыре активных центра (атомы железа) для связывания кислорода.

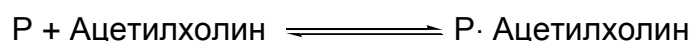
Активный центр формируется из аминокислотных остатков, зачастую отстоящих далеко друг от друга в пептидной цепи. Собранными в одном месте они оказываются в результате образования вторичной и третичной структуры. Поэтому при денатурации белков активные центры разрушаются и биологическая активность белков утрачивается.

Ингибиторы функций белков

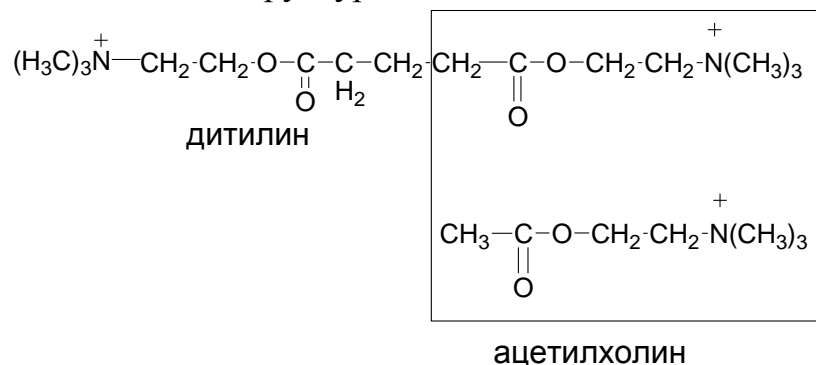
Хотя взаимодействие белка с лигандом отличается высокой специфичностью, всегда можно подобрать вещество – природное или синтетическое, которое является структурным аналогом лиганда и тоже

комплементарно центру связывания. Если такой аналог ввести в организм, то он будет соединяться с соответствующим белком вместо естественного лиганда, в результате чего функция белка окажется заблокированной. Вещества, взаимодействующие с активным центром белка и блокирующие его функции называют *ингибиторами* (чаще всего это термин применяют по отношению к веществам, блокирующим функцию ферментов). Например, молекула угарного газа CO достаточно сходна с молекулой кислорода O₂, чтобы присоединяться к гемоглобину. Сродство CO к гемоглобину примерно в 200 раз больше, чем сродство кислорода, и поэтому даже при низкой концентрации угарного газа в воздухе (0,1–0,3 %) значительная часть гемоглобина оказывается заблокированной угарным газом и не участвует в транспорте кислорода. В результате может наступить тяжелое отравление, нередко со смертельным исходом. Следовательно, структурные аналоги естественных лигандов могут быть ядами.

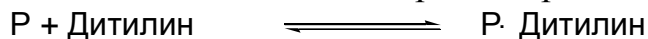
В нервно-мышечных синапсах медиатором передачи возбуждения с нерва на мышцу служит ацетилхолин. В процессе передачи возбуждения ацетилхолин соединяется с белком-рецептором (Р):



Дитилин является структурным аналогом ацетилхолина:



Дитилин тоже может соединяться с рецептором ацетилхолина:



При введении в организм дитилин блокирует рецепторы ацетилхолина; вследствие этого нарушается передача импульса и возникает расслабление мышц (паралич). Дитилин применяют для расслабления мышц (миорелаксант) при кратковременных операциях и эндоскопических обследованиях. Таким образом, аналоги естественных лигандов могут быть лекарственными веществами.

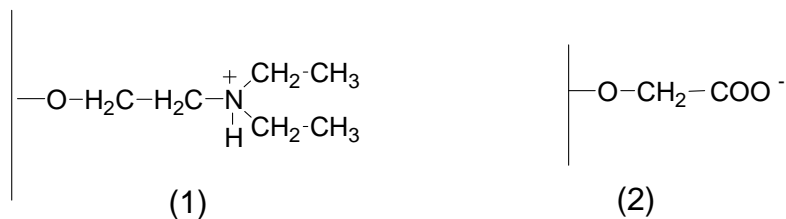
Выделение индивидуальных белков

Процедура выделения какого-либо белка начинается с переведения белков ткани в раствор. Для этого ткани измельчают и разрушают клетки с помощью специальных приборов – гомогенизаторов или просто растиранием с песком. Нерастворимые части ткани из гомогената осаждают центрифугированием. В надосадочной жидкости – экстракте – содержатся растворимые белки. В экстракте, наряду с веществами небелковой природы, присутствует много разных белков, и поэтому главная трудность выделения индивидуального белка состоит именно в его отделении от других белков. Все белки как соединения одного класса обладают сходными свойствами, и их разделение основано на небольших различиях в свойствах разных белков. В процессе выделения по возможности избегают денатурирующих воздействий: работу проводят при температуре около 0°C, не применяют сильноокислых или сильнощелочных растворов.

Избирательная денатурация. Многие белки денатурируются и выпадают в осадок при нагревании раствора до 50–70°C или при подкислении до pH 5. Если выделяемый белок выносит эти условия, то часть посторонних белков можно удалить из раствора таким образом.

Различия в растворимости. Чаще всего используют зависимость растворимости белков от концентрации сульфата аммония. Если его добавить в раствор в небольшом количестве (10 г на 100 мл раствора), то наименее растворимые белки выпадут в осадок. Осадок отделяют центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляют еще 10 г сульфата аммония, получают второй осадок. Продолжая эту процедуру, получают ряд фракций: в одной из них содержание искомого белка больше, чем в других. Таким же образом можно фракционировать белковые смеси, добавляя возрастающие количества ацетона или спирта.

Различия в количестве и природе ионогенных групп. Эти свойства позволяют фракционировать белки методами ионообменной хроматографии и электрофореза. Все белки содержат свободные концевые амино- и карбоксильные группы, которые способны ионизироваться: при подкислении раствора степень ионизации анионных групп снижается, а катионных – повышается, при подщелачивании – наоборот. Для хроматографии белков применяют ионообменники на основе целлюлозы, например, диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭЦ), содержащие катионные группы (1) и карбоксиметилцеллюлозу (2) КМЦ, содержащую анионные группы:



Прочность связывания белков с ДЭАЭЦ тем выше, чем больше в молекуле карбоксильных групп. Белки, адсорбированные на ДЭАЭЦ можно смыть растворами с возрастающей концентрацией NaCl: вначале элюируются слабо связывающиеся белки, а по мере увеличения концентрации соли и другие белки в порядке возрастания их сродства к ДЭАЭЦ. Аналогично применяют и КМЦ, но сродство к ней прямо пропорционально числу аминокрупп в белке.

Электрофорез для разделения белков применяют во множестве вариантов. Например, электрофорез на бумаге: на полоску фильтровальной бумаги, пропитанную буферным раствором, наносят раствор белков и включают ее в электрическую цепь с постоянным током. Полоску бумаги, чтобы предотвратить ее высыхание помещают в герметически закрытой камере.

Белки на электрофореграмме обнаруживают, обрабатывая полоску бумаги красителем, связывающимся с белками – обычно бромфеноловым синим. Такой метод мало пригоден для выделения белков в количествах, достаточных для их дальнейшего изучения. Для получения больших количеств очищенного белка вместо полоски бумаги часто используют толстый блок какого-либо инертного материала – крахмала или полимера – полиакриламид.

Различия по молекулярной массе. Позволяют разделять белки методами гель-фильтрации или ультрацентрифугирования.

Гель-фильтрация: этот метод основан на применении специальных полимерных веществ, набухшие зерна которых имеют поры определенного размера. Чаще всего используется сефадекс, гранулы которого построены из трехмерной сети полисахаридных цепей декстрана. Небольшие молекулы белка легко диффундируют внутрь зерен сефадекса, в то время как диффузия крупных молекул затруднена. Это явление лежит в основе молекулярного просеивания методом гель-фильтрации. Гелеобразную массу набухшего сефадекса помещают в колонку, на поверхность геля наносят слой белкового раствора и затем через колонку пропускают буферный раствор. Белковый раствор вместе с буфером перемещается вдоль колонки между гранулами сефадекса. В результате диффузии молекулы белков могут проникать внутрь гранул и некоторое время удерживаться там. Белки проходят через колонку медленно, причем тем мед-

леннее, чем меньше их молекулярная масса, т.к. они легче диффундируют внутрь гранул. В результате в колонке образуются отдельные зоны белков, причем молекулярная масса белков тем больше, чем ниже расположена зона. Далее пропускают буферный раствор и собирают жидкость, вытекающую из колонки небольшими порциями в ряд пробирок, получают фракции белков, отличающихся по молекулярной массе. Белки вымываются (элюируются) из колонки в порядке убывания молекулярной массы.

Ультрацентрифугирование. На поверхность буферного раствора, налитого в кювету ультрацентрифуги, наносят тонкий слой белковой смеси и кювету помещают в ротор. При вращении ротора происходит разделение (расслоение) белковой смеси – более крупные белки оседают на дно кюветы, более мелкие – остаются на поверхности. Положение каждой белковой зоны регистрируется специальной оптической системой по показателю преломления.

Различия по специфичности к лигандам используют в методе, который называется афинной хроматографией. В этом варианте хроматографии в качестве сорбента применяют инертный полимер с присоединенным к нему специфическим лигандом того белка, который хотят выделить (рис. 1.5). Через колонку сорбента пропускают раствор белков, с сорбентом связывается только тот белок, активный центр которого комплементарен лиганду (а), другие белки удаляются из колонки. Затем через колонку пропускают раствор с высокой концентрацией свободного лиганда, в этих условиях образуется свободный комплекс белка с лигандом (б), который элюируется с колонки.

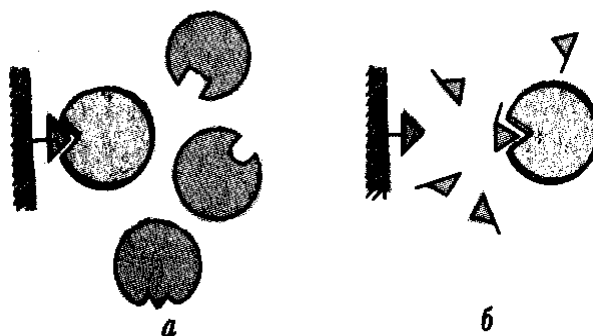


Рис. 1.5. Афинная хроматография

Выделение индивидуального белка требует последовательного применения многих приемов, причем все они подбираются эмпирически, методом проб и ошибок. Поэтому разработка процедуры выделения нового белка остается сложной и трудоемкой задачей.

Раздел 2. ФЕРМЕНТЫ

Наука о ферментах составляет важный раздел современной биохимии. Ферментология или энзимология является учением о ферментах (энзимах) – биологических катализаторах белковой природы, образуемых любой живой клеткой и обладающих способностью активировать различные химические реакции, происходящие в организме.

Ферменты нашли широкое применение во многих областях науки и промышленности. Ферменты имеют и большое практическое значение, т.к. многие отрасли промышленности – виноделие, хлебопечение, сыроварение, производство спирта, чая, аминокислот, витаминов, антибиотиков – основаны на использовании различных ферментативных процессов. Поэтому изучение свойств и механизма действия ферментов позволяет химикам создавать новые, более совершенные катализаторы для химической промышленности.

Краткая история учения о ферментах

История ферментов уходит в далекое прошлое. Еще на заре развития человеческого общества люди сталкивались с различными ферментативными процессами и использовали их в жизни. Спиртовое и молочнокислое брожение, применение заквасок при приготовлении хлеба, использование сычуга для изготовления сыров и др. – все эти ферментативные процессы хорошо известны с незапамятных времен.

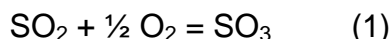
Одними из первых исследователей, занимавшихся изучением ферментативных процессов, были Реомюр и Спалланцани. В своих опытах по перевариванию мяса в желудке птиц они впервые поставили вопрос о необходимости изучения химического состава пищеварительных соков. Термин “ферменты” ввел в науку голландский ученый Ван Гельмонт (от лат. Fermentum – закваска), слово “энзим” происходит от древнегреческого слова “эн зюме” (“в дрожжах”). Русский ученый К.С. Кирхгоф (1814) показал, что в вытяжке из проросшего ячменя содержится вещество, которое вызывает превращение крахмала в сахар. Таким образом, Кирхгофом впервые был получен ферментный препарат амилазы (фермент, расщепляющий крахмал) и эту дату считают датой возникновения энзимологии.

В настоящее время работами большой армии ученых как в нашей стране, так и за рубежом учение о ферментах успешно развивается. Сейчас известно около 1000 ферментов.

История изучения ферментов тесно переплетается с историей изучения катализа вообще. Напомним, что катализом называют ускорение химической реакции, вызванное добавлением малых, нестехиометрических количеств определенного вещества – катализатора. Например, платина ускоряет разложение пероксида водорода на кислород и воду, кислоты ускоряют разложение белков на аминокислоты, мочевины на CO_2 и NH_3 и т.д. После завершения реакции катализатор обнаруживается в смеси в том же количестве, в котором был добавлен. Шведский химик Берцелиус в 1835 г. опубликовал работу, в которой сопоставлял такие процессы, как брожение, действие солода на крахмал, переваривающее действие желудочного сока – с одной стороны, и разложение крахмала под действием кислот, разложение перекиси водорода платиной – с другой стороны. Он правильно отметил то общее, что объединяет эти процессы: катализатор участвует в реакции не в стехиометрических количествах; казалось, что катализатор вообще не участвует в реакции, а влияет на нее только своим присутствием. Именно Берцелиус ввел в употребление термин “катализ” в его теперешнем значении, а раньше он применялся как синоним термина “разложение”.

Понятие о катализе

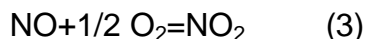
Разумеется, катализатор ускоряет реакцию не просто своим присутствием, а взаимодействуя с веществом, подвергающимся превращению. Разберем такой пример. Оксид серы (II) – сернистый ангидрид – при взаимодействии с кислородом окисляется в оксид серы (III) – серный ангидрид:



Если к этой реагирующей смеси добавить диоксид азота, то образование SO_3 ускоряется. Это происходит потому, что в присутствии диоксида азота начинается еще одна реакция, ведущая также к образованию SO_3 :

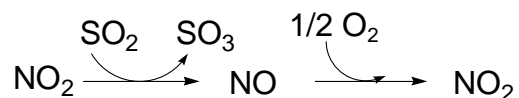


Образующийся оксид азота в свою очередь может окисляться кислородом, снова превращаясь в диоксид:

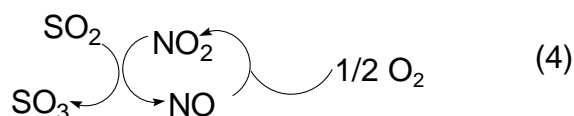


Это обстоятельство и позволяет выделить диоксид азота как катализатор среди прочих реагентов. Поскольку диоксид азота не расходуется, точнее, сначала расходуется, но тут же регенерируется, его можно добавлять в небольших количествах, в то время как другие реагенты (SO_2 и O_2) требуются в эквимольных стехиометрических количествах.

Таким образом, в смеси одновременно протекают реакция (1) и система реакций (2) и (3). Реакции (2) и (3) образуют единый процесс, т.к. это последовательные реакции:



Начало и конец этой схемы одинаковы, поэтому ее можно представить так:



Из схемы видно, что катализатор совершает циклические превращения, принимая попеременно формы NO_2 и NO , и в ходе этих превращений осуществляет перенос атома кислорода на молекулу SO_2 . Следовательно, одна молекула катализатора может превратить в SO_3 сколько угодно большое количество молекул SO_2 .

В реакции (1) и в системе реакций (4) исходные вещества и конечные продукты одинаковы, различны лишь пути. Или катализатор открывает новый дополнительный путь превращения исходных веществ в продукты реакции и тем самым увеличивает скорость образования продукта.

Таким образом, к основным характеристикам катализа относятся следующие: 1) катализаторы ускоряют химические реакции, 2) катализаторы не изменяют направление хода химической реакции, а только ускоряют достижение состояния равновесия.

Отличие ферментов от других видов катализаторов

Ферменты – это белки, и подобно всем белкам они могут избирательно присоединять определенные вещества – лиганды. Однако, в отличие от прочих белков фермент катализирует химические превращения лиганда. Лиганд, подвергающийся химическому превращению, называют *субстратом* фермента. Поскольку ферменты по своему действию являются катализаторами, следовательно для них характерны все осо-

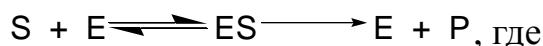
бенности процесса катализа. Наряду с этим ферменты имеют свои определенные отличия, к которым относятся “космические” скорости катализируемых ими реакций, очень сложная химическая структура и высокая специфичность действия.

Например, в организме человека разложение перекиси водорода катализируется ферментом каталазой со скоростью в $2 \cdot 10^{11}$ превышающей скорость некатализуемой реакции и в 10^7 в случае катализа платиной; пепсин (желудочный фермент) расщепляет белки: один грамм пепсина за 1 час способен гидролизовать 50 кг яичного белка, а 1.6 г амилазы, синтезируемой в поджелудочной и слюнных железах за 1 час может расщепить 175 кг крахмала.

Сложность структуры ферментов обусловлена тем, что все они являются белками, т.е. высокомолекулярными соединениями с большим молекулярным весом.

Высокая специфичность действия ферментов проявляется в том, что каждый фермент катализирует только одну или несколько близких реакций (в отличие от химических катализаторов).

Действие ферментов как биологических катализаторов можно изобразить следующей формулой:



E – фермент, S – субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, промежуточное соединение, образующееся в ходе реакции, P – продукты реакции.

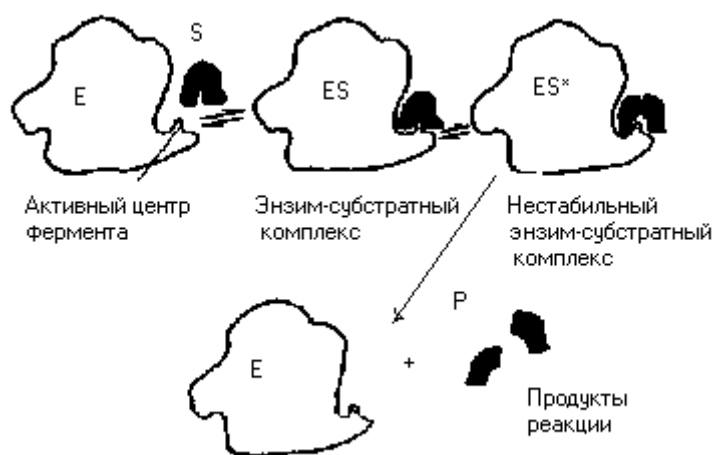


Рис. 2.1. Схема взаимодействия фермента с субстратом

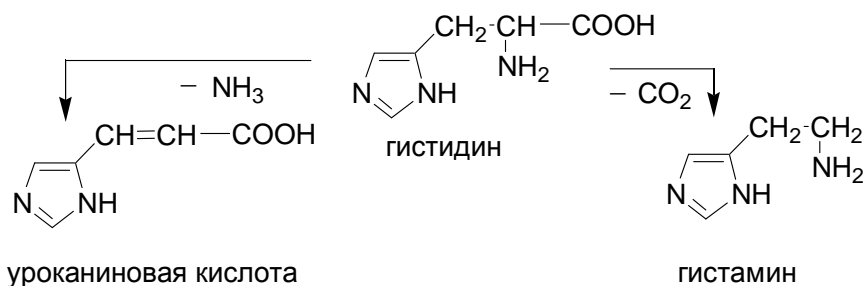
Действие фермента на субстрат приводит к активированию субстрата, в результате чего повышается скорость реакции. Основное значение в этом имеет образование *фермент-субстратного комплекса*,

скорость образования которого определяет скорость всей реакции. Фермент–субстратный комплекс распадается на фермент и продукты реакции.

Специфичность действия ферментов

Ферменты представляют собой белковое тело, имеющее форму глобулы, структура глобулы такова, что в определенных местах на ее поверхности располагаются функциональные группы составляющих ее аминокислот, так называемые, активные центры. В составе активного центра условно выделяют несколько участков, одни из которых обеспечивают присоединение субстрата к молекуле фермента (их называют контактными – как в случае самосборки протомеров в олигомерных белках), другие – каталитические – ответственны за процесс активации субстрата. В этих участках имеются различные функциональные группировки, которые находятся в строго зафиксированном положении по отношению друг к другу. Эта особенность строения активного центра объясняет специфичность действия фермента (субстратная специфичность фермента), т.к. образование фермент–субстратного комплекса возможно только в случае структурного подобия субстрата и активного центра фермента или иначе – структура активного центра фермента комплементарна структуре его субстрата.

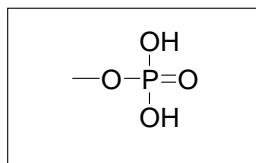
Каждый фермент катализирует не любое из всех возможных превращений субстрата, а какое–либо одно. Называют это свойство **специфичностью пути превращения**. Например, гистидаза и гистидиндекарбоксилаза имеют одинаковую субстратную специфичность (гистидин), но катализируют разные превращения гистидина. При действии гистидазы отщепляется аминогруппа (в виде аммиака), а гистидиндекарбоксилазы – карбоксильная группа (в виде CO_2):



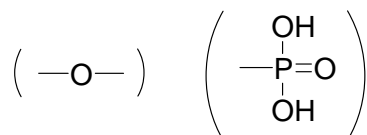
Специфичность ферментов условно подразделяется на несколько видов:

1. Относительная специфичность. Ею обладают ферменты, которые действуют на соединения с определенным видом связи. Например, протеиназы гидролизуют все соединения, имеющие в составе пептидную связь, эстеразы расщепляют эфирную связь $-O-$.

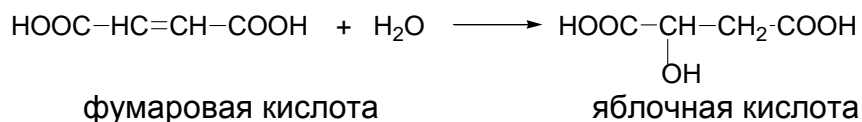
2. Групповая специфичность. Характерна для ферментов, которые действуют на субстраты, имеющие одинаковый тип связи и одну из функциональных группировок. К ним относятся, например, фосфоэстеразы, гидролизующие субстраты следующей структуры :



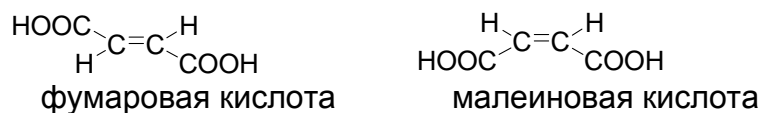
Для их действия обязательным условием является наличие эфирной связи и остатка фосфорной кислоты



3. Абсолютная специфичность. Характеризует ферменты, действующие только на один субстрат с вполне определенной структурой. Например, фумараза катализирует только реакцию фумаровой кислоты с водой:



4. Стереохимическая специфичность. Следует выделить в отдельный вид специфичности – стереохимическую специфичность, при которой фермент будет действовать только на определенный стереоизомер субстрата. Например, малеиновая кислота, которая является цис-изомером фумаровой кислоты, не может быть субстратом фумаразы:



Кофакторы ферментов

Многие ферменты для проявления каталитической активности нуждаются в присутствии некоторых веществ непептидной природы – **кофакторов**. Различают две группы кофакторов – ионы металлов и коферменты, которые представляют собой органические вещества.

Металлозависимые ферменты

Около трети всех известных ферментов содержит ион металла или активируется ионами металлов. В роли кофактора могут выступать ионы различных металлов – они могут участвовать в присоединении субстрата, собственно в катализе, в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента, в стабилизации четвертичной структуры.

Таблица 2.1. Некоторые металлозависимые ферменты

Фермент	Ион металла	Функция иона металла
Аденилатдезаминаза	K^+	Стабилизация третичной структуры
Гексокиназа	Mg^{2+}	Связывание субстрата
Енолаза	$3Mg^{2+}$	Связывание субстрата и катализ
Пируваткарбоксилаза	$4Mn^{2+}$	Катализ
α -Амилаза	Ca^{2+}	Стабилизация третичной структуры
Транскетолаза	Ca^{2+}	Стабилизация четвертичной структуры

Активность металлозависимых ферментов после удаления металла либо утрачивается полностью, либо заметно снижается.

Коферменты

Коферменты – это органические вещества, как правило, неаминокислотной природы, непосредственно участвующие в катализе в составе фермента.

Фермент, содержащий кофермент, называют *холоферментом*, а белковую часть такого фермента – *апоферментом*. Реакция образования холофермента обратима:

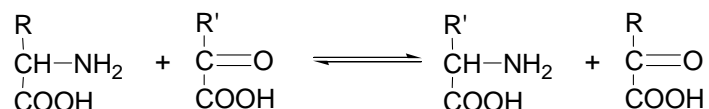


В некоторых случаях в условиях живой клетки равновесие сильно смещено влево и кофермент присоединяется к апоферменту вместе с субстратом в момент реакции. Другой крайний случай – стабильные холоферменты, содержащие прочно связанный кофермент. Такие коферменты представляют собой сложные белки.

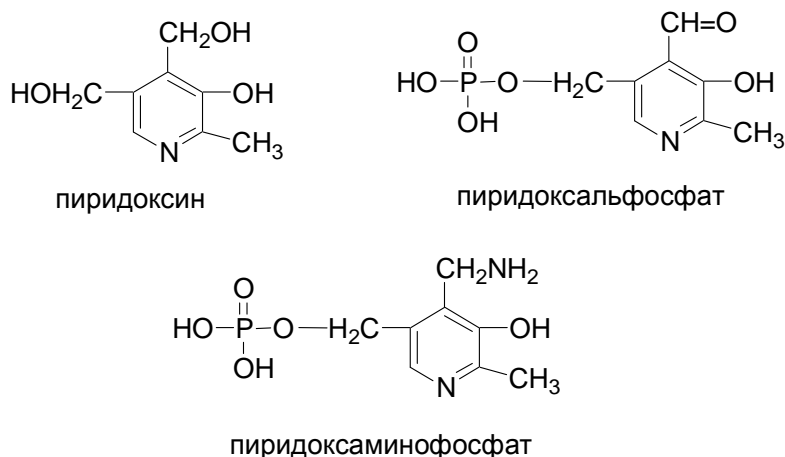
Взаимодействие кофермента с апоферментом отличается высокой специфичностью. Это объясняется, как и в случае субстратной специфичности, наличием в апоферменте центра связывания, комплементарного коферменту.

Рассмотрим некоторые важные типы реакций, катализируемых ферментами с участием коферментов.

Аминотрансферазы. Эти ферменты катализируют реакции *трансаминирования* – переноса аминогруппы с α -аминокислоты на α -кетокислоту:



Коферментом аминотрансфераз служит **пиридоксальфосфат** – производное пиридоксина (витамина В₆). Пиридоксальфосфат в ходе реакции трансаминирования образует пиридоксаминфосфат:



Пиридоксальфосфат присоединяется к центру связывания на молекуле белка за счет образования альдиминной связи с ε-аминогруппой одного из остатков лизина пептидной цепи. Кроме того, между белком и пиридоксальфосфатом образуются ионные связи с участием фосфатного остатка и заряженного атома азота в пиридиновом цикле (рис. 2.2):

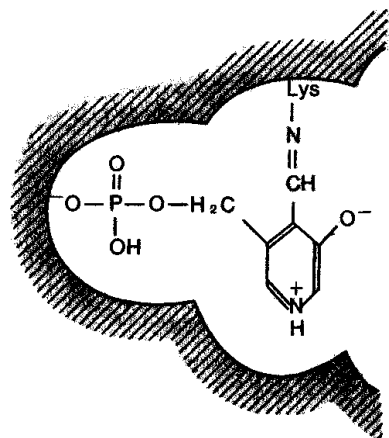
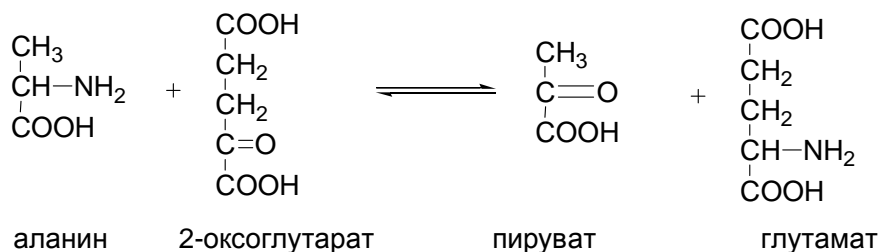


Рис. 2.2. Пиридоксальфосфат в активном центре фермента

В организме человека имеется несколько аминотрансфераз, отличающихся субстратной специфичностью. Аланин-2-оксоглутаратаминотрансфераза катализирует перенос аминогруппы с аланина на 2-оксоглутарат:



Реакции трансаминирования происходят в две стадии (полуреакции). Если к раствору фермента добавить только один из двух субстратов – аланин, то произойдет первая полуреакция (рис. 2.3). Аминогруппа аланина присоединяется к углероду альдиминной группы фермента: альдиминная связь между коферментом и белком заменяется на альдиминную связь между коферментом и аланином. Далее происходит внутримолекулярная перестройка в области альдиминной связи и гидролиз с образованием аминогруппы на коферменте и кетогруппы на бывшей аминокислоте (теперь это уже α-кетокислота). В целом, в результате этой полуреакции пиридоксальфосфат (пиридоксальдиминофосфат) пре-

вращается в пиридоксальдиминфосфат, а аланин – в пировиноградную кислоту:

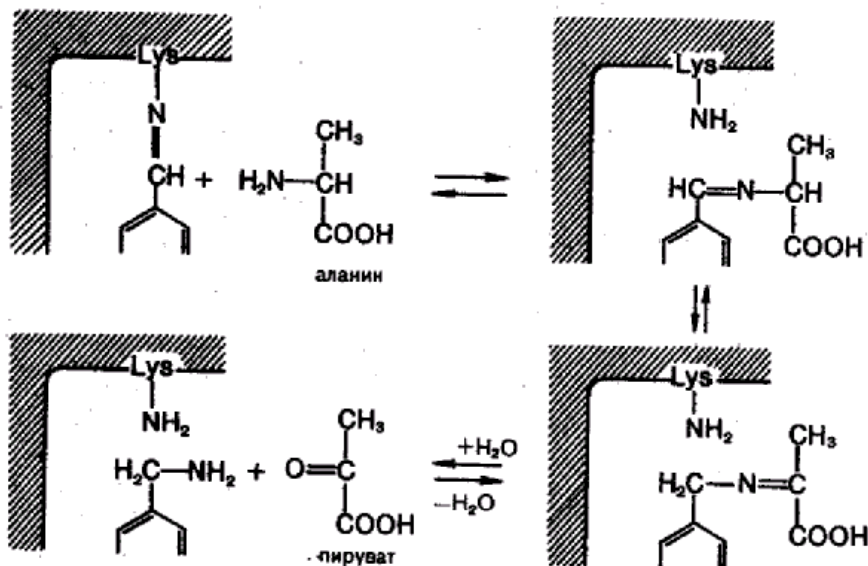
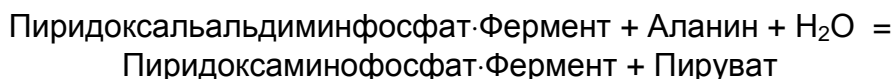
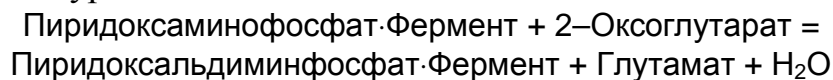


Рис. 2.3. Полуреакция трансаминирования

При наличии второго субстрата – 2-оксоглутаровой кислоты – произойдет вторая полуреакция:

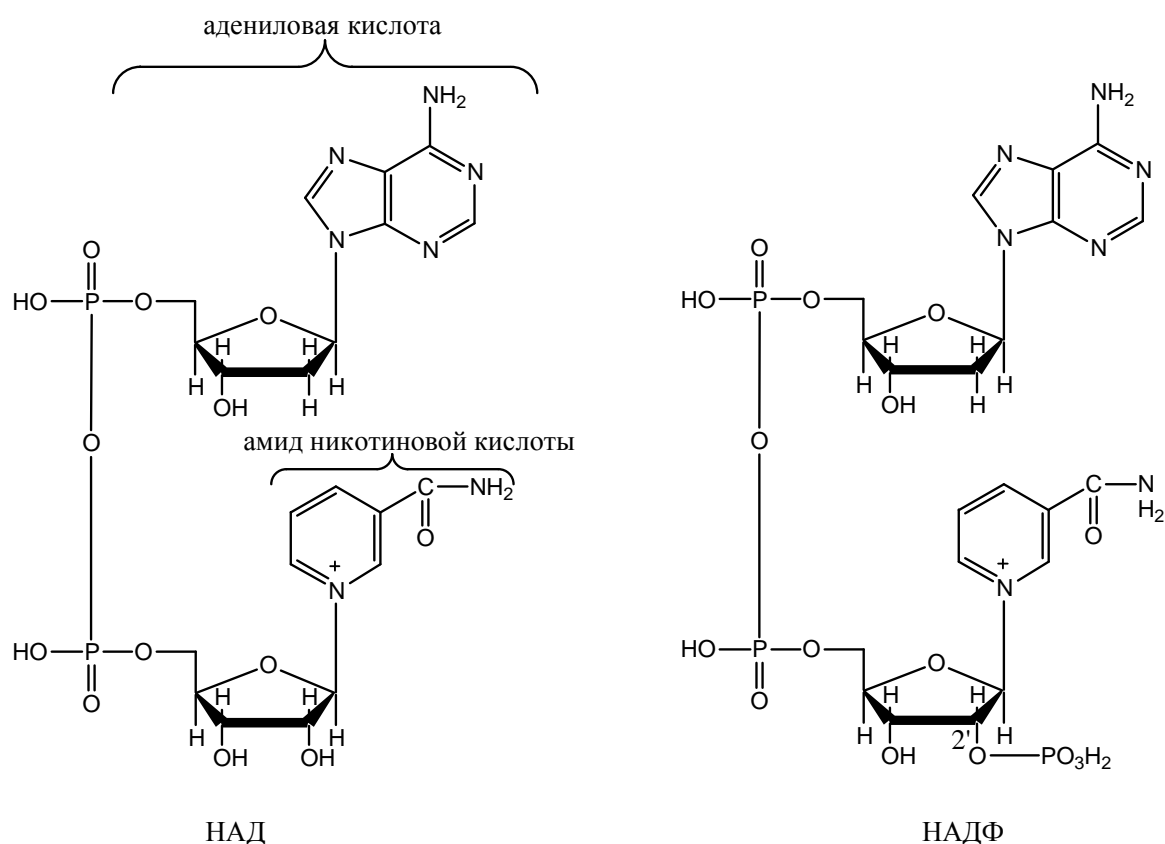


В этой полуреакции фермент переходит в начальную форму и образуется второй продукт реакции – глутамат. Механизм этой полуреакции такой же, как и первой, но протекает она в обратном направлении. Суммарный результат двух полуреакций – перенос аминогруппы с аланина на 2-оксоглутарат.

Конечно, в этом процессе участвуют и функциональные группы белковой части фермента, а не только кофермент. Субстратная специфичность разных аминотрансфераз определяется исключительно белковой частью, поскольку пиридоксальфосфат функционирует в качестве кофермента не только в реакциях трансаминирования, но и в некоторых реакциях других типов (изомеризация, декарбоксилирование, дегидратация).

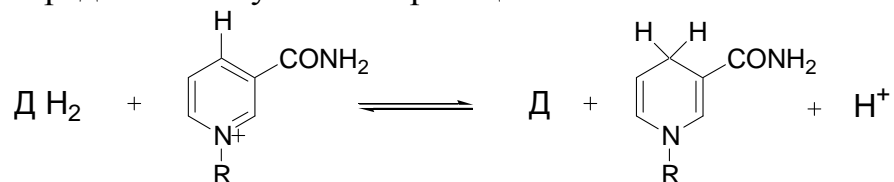
НАД-зависимые дегидрогеназы. В реакциях, катализируемых этими ферментами, в качестве кофермента участвует никотинамидадениннуклеотид (НАД). Две половины молекулы НАД, объединенные свя-

зью между остатками фосфорной кислоты, построены по одинаковому плану:



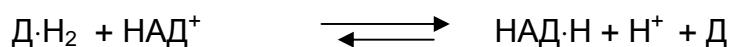
Одна половина представляет собой остаток нуклеотида (адениловой кислоты). Другая половина – тоже нуклеотид; его азотсодержащая гетероциклическая группа представлена амидом никотиновой кислоты. Никотиновая кислота – это витамин РР.

НАД-зависимые дегидрогеназы катализируют реакции окисления веществ путем дегидрирования; при этом окисляемое вещество служит донором водорода ($D \cdot H_2$), а НАД выполняет роль акцептора водорода, т.е. восстанавливается. Остаток никотинамида в молекуле НАД принимает непосредственное участие в реакции:

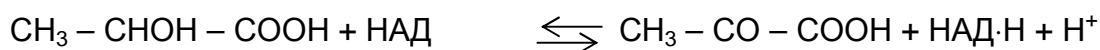


Отметим, что из двух атомов водорода (2 протона + 2 электрона), отщепляемых от субстрата, к НАД присоединяются один протон (второй переходит в среду) и два электрона, в результате чего утрачивается по-

ложительный заряд пиридинового цикла НАД. Поэтому в уравнениях реакций окисленный и восстановленный НАД изображают следующим образом:

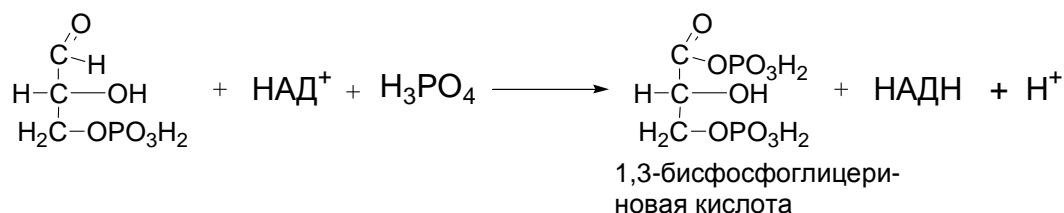


Например, лактатдегидрогеназа катализирует дегидрирование молочной кислоты с образованием пировиноградной кислоты:

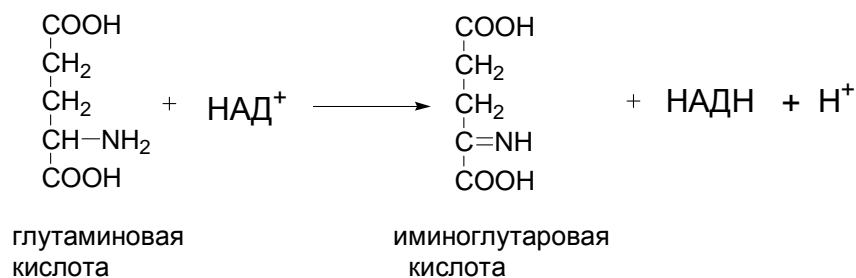


НАД-зависимые дегидрогеназы катализируют следующие типы реакций:

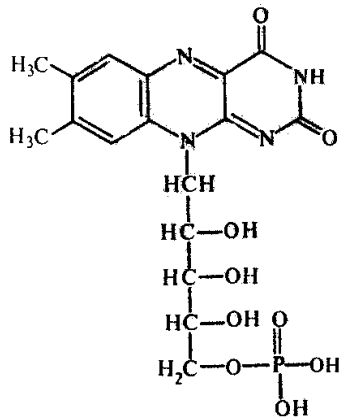
1. Дегидрирование гидроксильных групп (пример выше)
2. Дегидрирование альдегидных групп. Примером может служить дегидрирование глицеральдегид-3-фосфата:



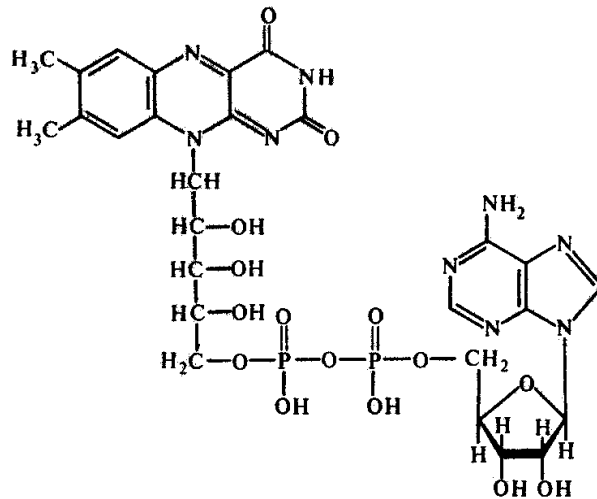
3. Дегидрирование аминогрупп. Например, глутаматдегидрогеназа катализирует дегидрирование глутаминовой кислоты:



Флавиновые дегидрогеназы составляют другую группу дегидрогеназ. Коферментами для них являются флавинадениндинуклеотид (ФАН) или флавиномононуклеотид (ФМН). Эти коферменты являются производными рибофлавина (витамина В₂). Рибофлавин содержит циклическую изоаллоксазиновую группировку и остаток пятиатомного спирта рибитола. ФМН представляет собой рибофлавин-5'-фосфат, а ФАД, кроме того, содержит остаток адениловой кислоты:

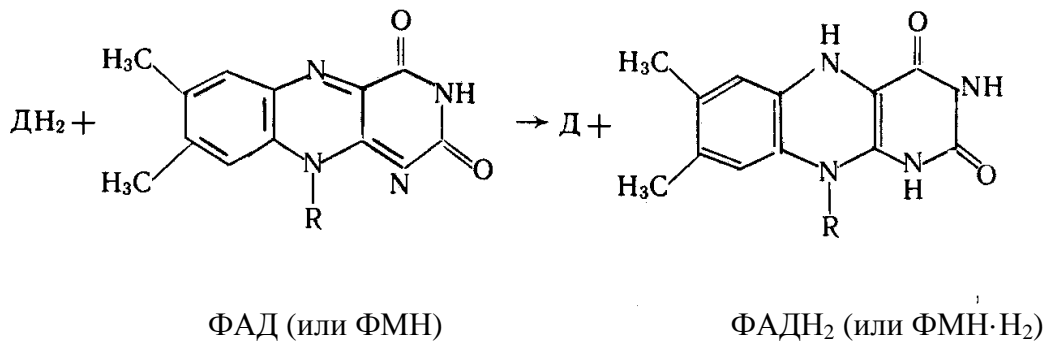


ФМН

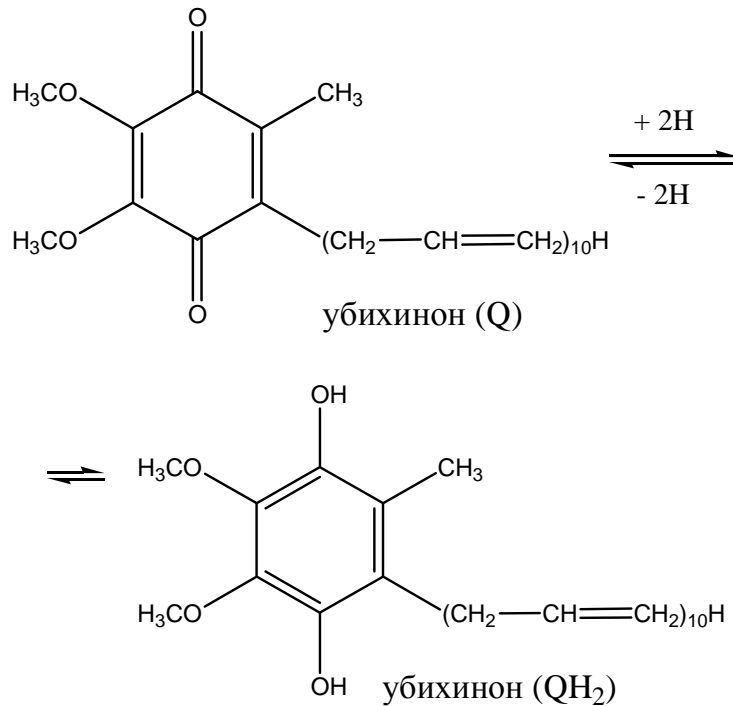


ФАД

Флавиновые коферменты прочно связаны с апоферментами, следовательно, флавиновые дегидрогеназы – это сложные белки. В ходе реакции отщепляемые от субстрата атомы водорода присоединяются к изоаллоксазиновой группировке кофермента:



К флавиновым ферментам, содержащим ФМН, принадлежит НАД·Н-дегидрогеназа, которая окисляет НАД·Н. Акцептором водорода в этой реакции служит кофермент Q (убихинон), который в клетке может существовать в окисленной и восстановленной формах (Q и QH₂):



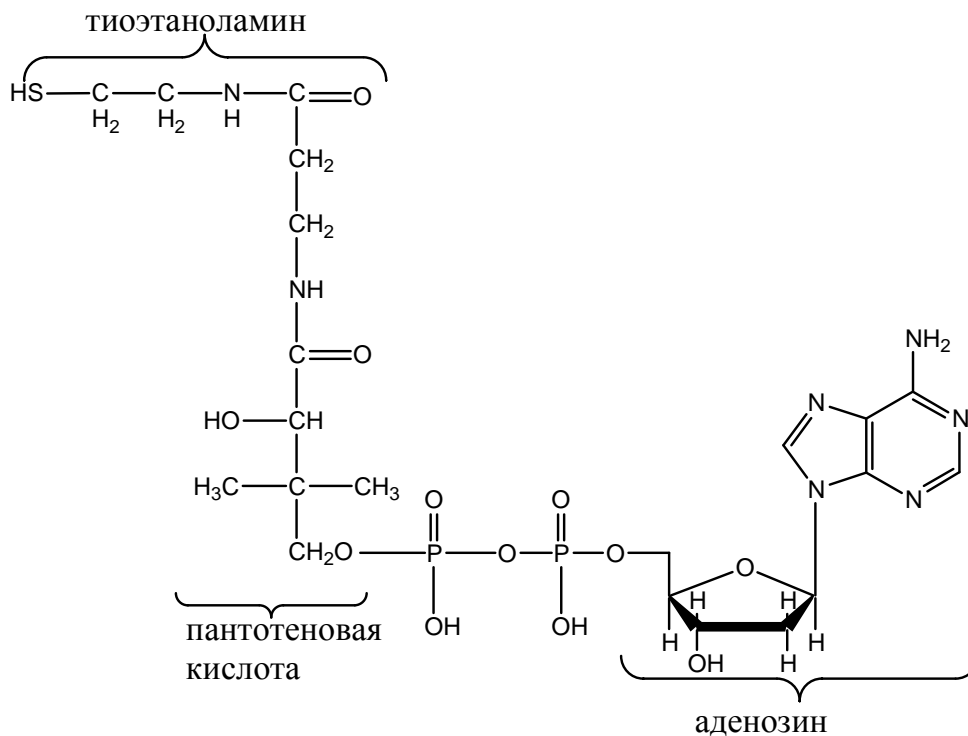
НАД·Н-дегидрогеназа переносит водород с НАД·Н на убихинон:



При этом атомы водорода сначала присоединяются к ФМН в составе НАД·Н-дегидрогеназы (первая полуреакция), а затем передаются на убихинон (вторая полуреакция).

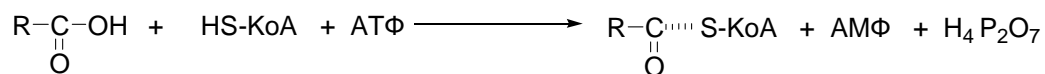
Дегидрогеназы, содержащие ФАД, катализируют отщепление водорода от групп $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ с образованием двойной связи. Примером может служить сукцинатдегидрогеназа, катализирующая окисление янтарной кислоты; акцептором водорода в этом случае служит убихинон.

Кофермент ацилирования (кофермент А, КоА). Молекула кофермента А построена из аденозин-3'-фосфат-5'-пирофосфата, соединенного сложноэфирной связью с пантотеновой кислотой, которая в свою очередь соединена амидной связью с β -тиоэтанололамином:

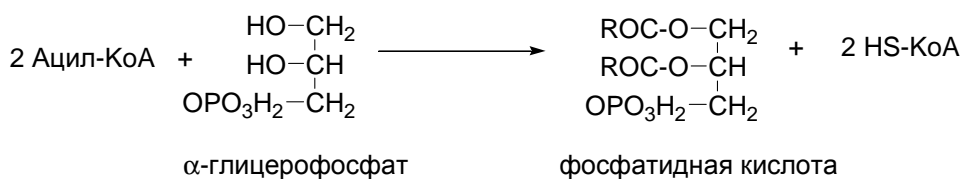


кофермент А

Пантотеновая кислота является витамином. Кофермент А участвует во множестве превращений карбоновых кислот в живой клетке. Карбоновые кислоты присоединяются своей карбоксильной группой к SH-группе кофермента А, образуя тиоэфирную связь. В уравнениях реакций кофермент А изображают символом HS-KoA, а ацильные производные – ацил-S-KoA или ацил-KoA. Ацильные производные KoA чаще всего образуются при действии ферментов, относящихся к группе ацил-KoA-синтетаз. Реакцию можно представить следующим образом:



Ацильный остаток в составе ацил-KoA может подвергаться многообразным превращениям или может быть перенесен без изменений на другое вещество. Реакции переноса катализируются ферментами группы ацилтрансфераз. Например, таким путем происходит перенос остатков высших жирных кислот на α-глицерофосфат при синтезе жиров:



КоА и его ацильные производные находятся в клетке в свободном состоянии и взаимодействуют с ферментом в момент реакции вместе с субстратом, являясь, по существу, вторым субстратом фермента.

Из рассмотренных выше примеров видно, что каждый из коферментов может существовать в двух формах, циклически превращающихся друг в друга: ФАД и ФАД·Н₂, КоА и ацил-КоА и т.д. Некоторые коферменты можно рассматривать как часть активного центра фермента, например, пиридоксальфосфат. Другие же участвуют в ферментативных реакциях скорее как субстраты – НАД, КоА, в этом случае превращение кофермента из одной формы в другую может вызываться действием двух разных ферментов. Например, превращение КоА в ацил-КоА катализирует ацил-КоА-синтетаза, а регенерация КоА происходит при действии ацилтрансферазы.

Классификация и номенклатура ферментов

В основе классификации ферментов лежит специфичность их действия. Все ферменты разделены на шесть основных классов по типу катализируемых ими реакций. Каждый класс разделен на подклассы и далее – на подподклассы по тому же принципу, т.е. по типу реакций.

1. Оксиредуктазы (окислительно-восстановительные реакции)

- 1.1. Действуют на группу –СН–ОН
- 1.2. Действуют на группу –С=О
- 1.3. Действуют на группу –СН–NH₂
- 1.4. Действуют на группу –СН–NH
- 1.5. Действуют на группу –СН=СН–
- 1.6. Действуют на НАДН

2. Трансферазы (перенос функциональных групп)

- 2.1. Переносят одноуглеродные остатки
- 2.2. Переносят альдегидные и кетонные группы
- 2.3. Переносят ацильные группы
- 2.4. Переносят гликозидные группы
- 2.5. Переносят фосфатные группы
- 2.6. Переносят группы, содержащие серу

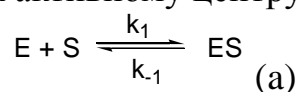
3. Гидролазы (реакции гидролиза)
 - 3.1. Действуют на сложноэфирные связи
 - 3.2. Действуют на гликозидные связи
 - 3.3. Действуют на пептидные связи
 - 3.4. Действуют на С–N-связи, отличающиеся от пептидных
 - 3.5. Действуют на кислотнo-ангидридные связи
4. Лиазы (присоединение по двойным связям)
 - 4.1. –C=C–
 - 4.2. –C=O
 - 4.3. –C =N
5. Изомеразы (реакции изомеризации)
6. Лигазы (образование связей)
 - 6.1. Образуют С–О-связи
 - 6.2. Образуют С–S-связи
 - 6.3. Образуют С–N-связи
 - 6.4. Образуют С–С-связи

Номенклатура ферментов. Исторически сложившиеся (тривиальные) названия ферментов часто строятся по названию субстрата с изменением суффикса на -аза (фумараза, аргиназа и т.д.). Комиссия по ферментам Международного биохимического союза разработала правила рациональной номенклатуры ферментов. Согласно этим правилам в названии фермента указываются его субстраты и основной класс, к которому принадлежит фермент. Например: 2.6.1.2 – аланин: оксоглутаратаминотрансфераза. Рациональные названия без дополнительных объяснений позволяют представить реакцию, которую катализирует данный фермент. Однако часто они довольно длинны, поэтому наряду с ними используются и тривиальные названия.

Основы кинетики ферментативных реакций.

Уравнение Михаэлиса-Ментен

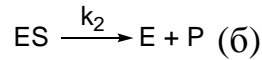
Скорость ферментативной реакции измеряют по убыли субстрата S или приросту продукта P за единицу времени. В простейшем случае реакцию можно представить как двухстадийный процесс. Первая стадия представляет собой образование фермент-субстратного комплекса, т.е. присоединение субстрата к активному центру фермента E:



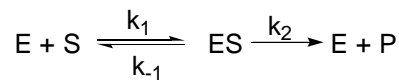
Константу этой реакции называют *субстратной константой*:

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

В отличие от других белков, фермент не только присоединяет лиганд (субстрат), но и катализирует его химическое превращение – это вторая стадия процесса; образовавшийся продукт отделяется от фермента:



Как видно из реакций (а) и (б), комплекс ES образуется только в одной реакции (с константой k_1), а распадается в двух: на E и S (реакция с константой k_{-1}) и на E и P (реакция с константой k_2):



Отношение суммы констант скорости реакций, в которых комплекс ES распадается, к константе скорости реакции, в которой он образуется, называют **константой Михаэлиса** K_M :

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

Легко видеть, что если $k_{-1} \gg k_2$, то $K_M \approx K_S$

График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата имеет вид гиперболы. При высокой концентрации субстрата, когда все молекулы фермента находятся в форме ES (полное насыщение), скорость реакции становится максимальной (V_{\max}). Очевидно, что при полунасыщении (половина молекул фермента находится в форме ES), скорость реакции равна $\frac{1}{2} V_{\max}$. Концентрация субстрата, при которой достигается эта скорость, и дает численную величину константы Михаэлиса (поэтому константу Михаэлиса называют также концентрацией Михаэлиса).

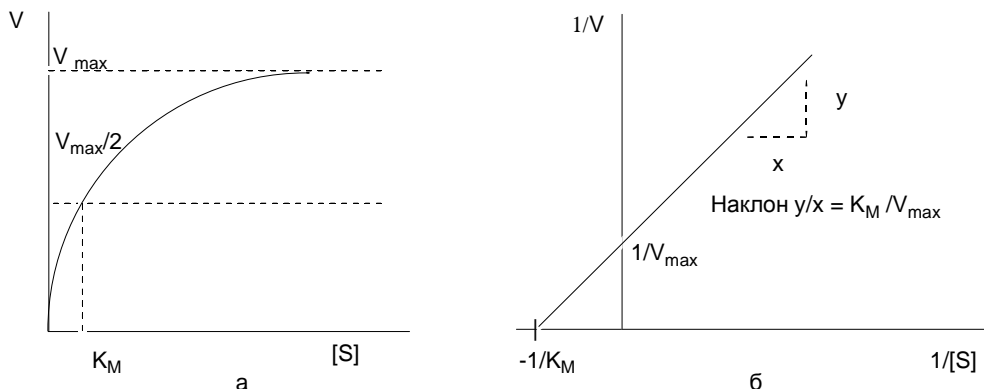


Рис. 2.4. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата (а, б)

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

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

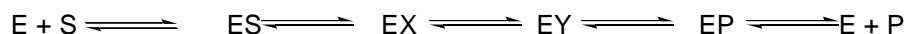
Решая это уравнение относительно K_M , получим

$$K_M = \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right) [S]$$

Отсюда также следует, что если $v = 1/2 V_{\max}$, то $K_M = [S]$.

В большинстве реакций в организме участвуют не один, а два субстрата, например, $A + B \rightleftharpoons C + D$. Взаимодействие ферментов с каждым из субстратов характеризуется собственной константой Михаэлиса K_M . Ее определяют по зависимости скорости реакции от концентрации данного субстрата при постоянной концентрации второго субстрата.

Мы рассмотрели простейший случай ферментативной реакции. В действительности промежуточных стадий может быть больше, и все они могут быть обратимыми:



Кроме того, возможны и другие параллельно протекающие реакции образования некоторых промежуточных продуктов. Но и в таких случаях уравнение Михаэлиса-Ментен оказывается справедливым, только K_M представляет собой более сложную функцию констант скорости частных реакций.

K_M и V_{\max} – важные характеристики фермента. Их можно определить по результатам измерения v при разных концентрациях S (рис. 2.4 а). Более точный результат дает метод Лайнуивера-Бэрка. Уравнение Лайнуивера-Бэрка представляет собой обратное уравнение Михаэлиса-Ментен:

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

График зависимости $1/V$ от $1/S$ – это прямая с наклоном K_M/V_{\max} , отсекающая на оси ординат отрезок $1/V_{\max}$ (рис. 2.4. б).

Единицы ферментативной активности

Поскольку в большинстве случаев количество фермента невозможно измерить в абсолютных единицах (например, в граммах), то приходится пользоваться условными единицами.

За **единицу фермента** (Е) принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин. Число единиц фермента в тканях определяют по формуле:

$$nE = \frac{\text{количество превращенного субстрата, мкмоль}}{\text{навеска ткани, г} \times \text{время инкубации, мин}}$$

Например, для определения лактатдегидрогеназы было взято 100 мг ткани печени, эту навеску инкубировали в течение 15 мин. в растворе субстрата и обнаружили, что образовалось 210 мкмоль продукта, следовательно, в печени содержится $210:(0,1 \times 15) = 140$ единиц лактатдегидрогеназы на 1 г печени.

Часто находят **удельную активность** фермента: она равна числу единиц фермента в образце, деленному на массу белка (в мг) в этом образце. Например, если в 1 г ткани печени содержится 140 единиц лактатдегидрогеназы и 200 мг белка, то удельная активность лактатдегидрогеназы в печени равна $140:200 = 0,7$ (мкмоль/мин)мг. Удельной активностью особенно часто пользуются при очистке ферментов: по мере удаления посторонних белков доля выделяемого фермента в препарате увеличивается, следовательно, возрастает удельная активность. По возрастанию удельной активности оценивают эффективность отдельных стадий очистки.

Если имеется очищенный индивидуальный фермент, то можно измерить его **молярную активность**; она равна числу единиц фермента в образце, деленному на количество фермента, выраженное в микромолях. Например, если в растворе фумаразы, содержащем 0,002 мкмоль фермента, обнаружено 240 единиц фермента (в мкмоль/мин), то молярная активность фумаразы равна 240 мкмоль/мин:

$$0,002 \text{ мкмоль} = 12 \times 10^4 \text{ мин}^{-1}.$$

Молярная активность указывает, сколько молекул субстрата превращается одной молекулой фермента за 1 минуту.

Ингибиторы ферментов

Ингибиторами ферментов называют вещества, снижающие их активность. Наибольший интерес представляют ингибиторы, взаимодействующие с активным центром фермента. Такие ингибиторы чаще всего являются структурными аналогами субстрата и комплементарны активному центру фермента. Механизм действия ингибиторов заключается в том, что ингибитор вступает в соединение с ферментом, образуя неактивный фермент-ингибиторный комплекс (EI) вместо активного фермент-субстратного (ES), что приводит к блокированию фермента. Торможение активности ферментов может быть обратимым и необратимым. В последнем случае ингибитор, являясь денатурирующим агентом, приводит к полному изменению структуры фермента, его инактивации. К таким ингибиторам относят сильные кислоты и щелочи, спирт, цианистые соли и т.д.

Различают также конкурентное и неконкурентное ингибирование. Конкурентное торможение возможно в том случае, когда ингибитор имеет структуру, близкую структуре активного центра. В основе этого вида ингибирования лежит конкуренция между субстратом и ингибитором за обладание ферментом. В результате этого ингибитор обратимо взаимодействует с тем участком в молекуле фермента, с которым обычно соединяется субстрат (рис. 2.5):

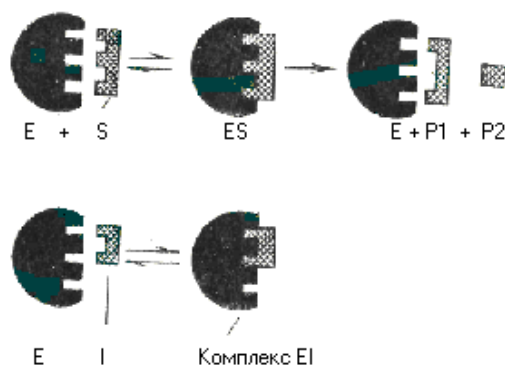


Рис.2.5. Схема действия конкурентного ингибитора

Из рисунка видно, что между молекулами фермента и субстрата имеется структурное соответствие, которое обеспечивает образование активного фермент-субстратного комплекса. Последний затем распадается с образованием продуктов реакции, а фермент выделяется в неизменном виде. В случае конкурентного торможения ингибитор (структурный аналог субстрата) присоединяется к ферменту в том же

участке, что и субстрат, в результате чего субстрат уже не может соединиться с ферментом. Конкурентное ингибирование обратимо и зависит от концентрации ингибитора и субстрата. Если концентрация ингибитора (I) выше, чем субстрата (S), образуется фермент-ингибиторный комплекс $E+S+I = EI+S$ и расщепление субстрата не произойдет. Но в случае избытка субстрата последний вытеснит ингибитор из фермент-ингибиторного комплекса и образуется фермент-субстратный комплекс с последующим распадом субстрата на продукты реакции: $E+S+I = ES+I = E+P+I$. При неконкурентном торможении ингибитор соединяется с ферментом не по месту присоединения с субстратом (не с активным центром), а где-то в другом участке молекулы фермента, что приводит к значительному снижению активности фермента. Действие ингибиторов часто приводит к необратимым последствиям – гибели организма. Например, при действии таких ингибиторов, как зарин (нервный газ) или тиофос (инсектицид) на холинэстеразу, прекращается расщепление ацетилхолина до холина – это приводит к непрерывной передаче нервных импульсов и постоянному сокращению мускульной ткани – организм погибает.

С другой стороны, ингибиторы – очень эффективные инструменты для исследования активного центра ферментов и механизма катализа. Ингибиторы, присоединяясь к активному центру фермента, “метят” его: если теперь фермент гидролизовать, то одна из аминокислот в гидролизате остается связанной с ингибитором. Таким образом узнают, какие аминокислоты и функциональные группы формируют активный центр.

Распределение ферментов в организме

Многие ферменты обнаруживаются практически во всех клетках организмов. Это ферменты, которые участвуют в процессах жизнеобеспечения клетки – таких, как синтез нуклеиновых кислот и белков, энергетический обмен и др. С другой стороны, некоторые ферменты обнаруживаются лишь в одном-двух органах – это так называемые органоспецифические ферменты. Например, урокиназа есть только в печени, кислая фосфатаза – только в предстательной железе и т.д. Внутри клеток ферменты также распределены неравномерно. Одни ферменты находятся в коллоидно-растворенном состоянии, другие – фиксированы в клеточных органеллах (ядро, митохондрии, лизосомы, мембраны).

При нормальных физиологических изменениях организма, например, при адаптации к переменным условиям среды, может изменяться не только каталитическая активность ферментов, но и их количество.

Активность ферментов, их количество изменяются также и при болезнях. Эти проявления болезней называют *энзимопатиями*. Энзимопатии бывают наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные). Например, врожденное отсутствие фермента гистидазы (находится в печени) проявляется как наследственная болезнь гистидинемия. Вследствие нарушения метаболизма гистидина, его концентрация в моче и крови больных значительно больше, чем у здоровых людей. Это в свою очередь ведет к нарушению обмена и других веществ и – как следствие к нарушению физического и умственного развития, обычно настолько резко, что больные не доживают до взрослого состояния. Таким образом, недостаточность даже одного фермента может оказаться несовместимой с жизнью. Другой пример – олигофрения (слабоумие) – у детей нарушен синтез фенилаланин-гидроксилазы – фермента, который обеспечивает синтез тирозина из фенилаланина. Следствием является накопление в организме высоких концентраций фенилаланина и продуктов его нарушенного обмена, оказывающее губительное действие на развитие организма, в том числе и мозга.

В плазме крови здоровых людей имеется небольшой по сравнению с клетками набор ферментов, и их концентрация значительно ниже, чем в клетках. Изменения ферментного состава крови при разных заболеваниях различны, поэтому определение ферментов в сыворотке крови используется как метод диагностики болезней и метод контроля эффективности лечения.

С целью диагностики определяют активность ферментов и в *биоптатах* – кусочках тканей (печени, мышц, слизистой оболочки кишечника и др.), взятых из органа с помощью специальных инструментов.

Применение ферментов в медицине

Применение ферментов в качестве лекарств. Некоторые ферменты нашли применение как лечебные средства. Например, при желудочных заболеваниях, сопровождающихся снижением содержания пепсина в желудочном соке, для улучшения пищеварения назначают препараты пепсина (заместительная терапия). Разные протеолитические препараты применяются при первичной обработке ран: гидролизуют белки разрушенных клеток, ферменты способствуют очищению раны и уменьшению воспалительных явлений. Например, при лечении вирусного конъюнктивита успешно применяют глазные капли, содержащие ДНКазы: фермент разрушает ДНК вируса и тем самым излечивает бо-

лезнь. Особенно широко применяют ферменты для предотвращения или лечения тромбозов – закупорки кровеносных сосудов сгустками крови.

Аспарагиназу применяют для лечения некоторых форм лейкозов (рак крови). Лечение основано на том, что аспарагин (одна из аминокислот, необходимых для синтеза белков) в лейкозных клетках не синтезируется, и клетки получают его из плазмы крови. Если ввести в кровь больного аспарагиназу, то аспарагин в плазме крови разрушается, и синтез белков в лейкозных клетках прекращается, поэтому клетки погибают. Известны и другие ферменты, пригодные для лечения злокачественных опухолей – их механизм действия такой же.

Применение ферментов как аналитических реактивов. Высокая субстратная специфичность ферментов делает их совершенно уникальными аналитическими реактивами: с помощью фермента можно определить его субстрат в смеси, содержащей множество других веществ. Ферментные методы все больше внедряются в практику клинического анализа. Этими методами измеряют содержание глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, молочной кислоты, холестерина и др.

Раздел 3. УГЛЕВОДЫ

Углеводы входят в состав клеток и тканей всех растительных и животных организмов. По массе углеводы составляют основную часть органического вещества на Земле, причем особенно распространены они в растительном мире, где они составляют 70–80% из расчета на сухое вещество. В животном организме содержится углеводов значительно меньше – около 2% от веса тела. Основные функции углеводов:

- 1) **энергетическая функция.** Углеводы на 60% обеспечивают организм энергией. При окислении 1 г углеводов выделяется 4,1 ккал энергии;
- 2) **пластическая функция.** Углеводы принимают участие в синтезе многих очень важных веществ для организма, таких как нуклеопротеины, липоиды, сложные ферменты, мукополисахариды и т.д. В растениях углеводы выполняют в основном опорную функцию;
- 3) **функция запасных питательных веществ.** Углеводы обладают способностью откладываться в организме в виде гликогена, который расходуется по мере надобности. Депо гликогена являются в основном печень и мышцы. При полноценном питании в печени может содержаться до 10 % гликогена от веса печени, в мышцах – до 2%. При неблагоприятных условиях, например, при голодании, запасы гликогена истощаются и его количество может снизиться до 0,2 %;
- 4) **защитная функция.** Вязкие секреты (слизи), выделяемые различными железами, богаты мукополисахаридами. Они предохраняют стенки полых органов от механических повреждений, от проникновения патогенных бактерий и вирусов;
- 5) **регуляторная функция.** В пище всегда содержится значительное количество сложного углевода – клетчатки, грубая структура которого вызывает механическое раздражение желудка и кишечника, участвуя таким образом в акте перистальтики;
- 6) **специфическая функция.** Отдельные представители углеводов выполняют особые функции в организме, например, участвуют в проведении нервных импульсов, образовании антител, обеспечении специфичности групп крови, нормальной деятельности высшей нервной системы. Например, глюкоза (содержится в соках, фруктах) – обязательный компонент крови и непосредственный источник энергии. В крови в норме содержится 0,08–0,11% глюкозы (5–6 г) – этого количества хватает для покрытия энергетических затрат организма человека в течение 15 мин. Пополнение запасов глюкозы происходит за счет резервных углеводов, в частности гликогена, запасаемому в печени.

Углеводы принимают участие в таком “космическом” процессе как фотосинтез:



Таким образом, углеводы являются химическими аккумуляторами энергии. Эта энергия освобождается в животных организмах в результате метаболизма углеводов. С химической точки зрения, это реакция окисления:



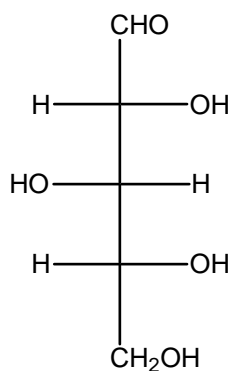
Часть этой энергии превращается в тепло, а большая доля – в новую химическую форму в виде аденозинтрифосфата (АТФ) и затем расходуется в процессе жизнедеятельности (сокращение мышц, передача нервных импульсов и т.д.)

Классификация углеводов

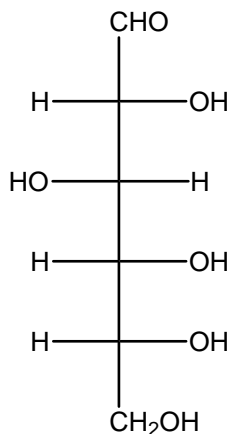
Углеводы – это органические соединения общей формулы $(\text{C}_n\text{H}_m\text{O})_n$, где $n \geq 3$. Различают моносахариды (или простые сахара) – простейшие углеводы, они не гидролизуются с образованием более простых углеводов. Моносахариды содержат от трех до девяти атомов углерода и выполняют роль мономерных звеньев при построении олиго- и полисахаридов с молекулярной массой до нескольких миллионов. Олигосахариды при гидролизе дают 2–10 молекул моносахаридов, полисахариды – состоят из сотен и тысяч молекул моносахаридов.

Моносахариды

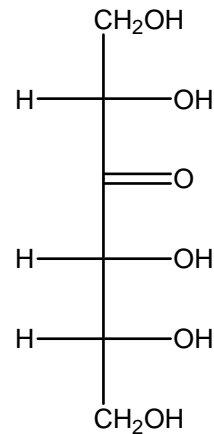
Моносахариды или монозы – содержат карбонильную группу (альдегидную или кетонную) и несколько гидроксильных групп. Монозы с альдегидной группой называются альдозами, с кетонной – кетозами. Окончание -оза характерно для названий всех моносахаридов: глюкоза, фруктоза, галактоза. В зависимости от длины цепи монозы делятся на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы и т.д.



альдопентоза



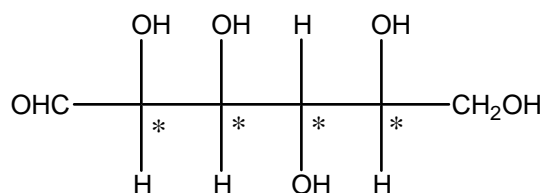
альдогексоза



кетогексоза

Стереоизомерия

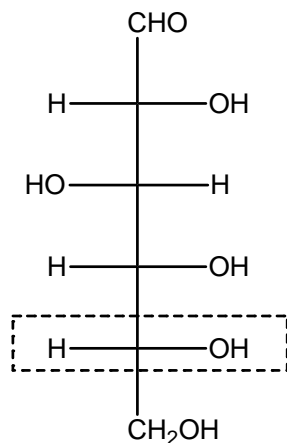
В моносахаридах имеется несколько хиральных центров (или асимметрических атомов углерода). Так, например, в гексозах их четыре:



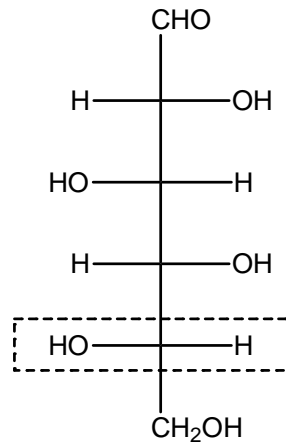
Следовательно, для гексоз существует $2^4 = 16$ изомеров (диастереомеров).

Для изображения стереомеров используют формулы (проекции) Фишера.

Относительная конфигурация моносахаридов, т.е. их принадлежность к D- или L-стереохимическому ряду определяется по конфигурации хирального центра, имеющего наибольший номер (наиболее отдаленного от карбонильной группы). Если при написании проекции Фишера, группа OH при наиболее удаленном атоме углерода находится справа, то моносахарид принадлежит к D-ряду, если же слева – то моносахарид принадлежит к L-ряду:

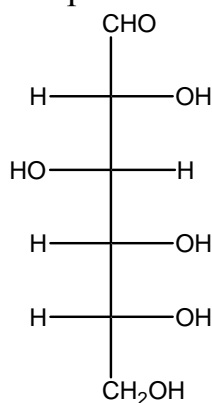


D-альдогексоза

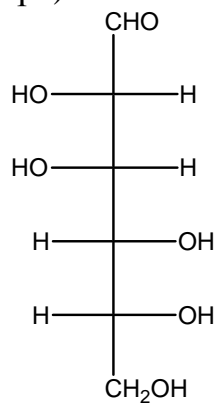


L-альдогексоза

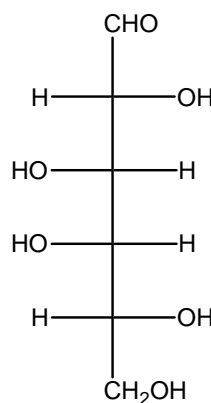
Стереомеры с различной конфигурацией остальных хиральных центров (при неизменности последнего атома углерода) называют диастереомерами или эпимерами (различаются конфигурациями только одного хирального центра):



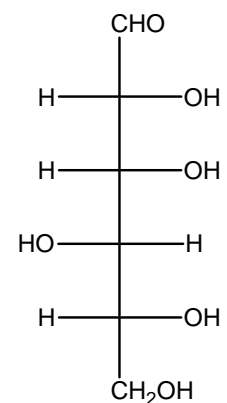
D-глюкоза



D-манноза



D-галактоза



D-гулоза

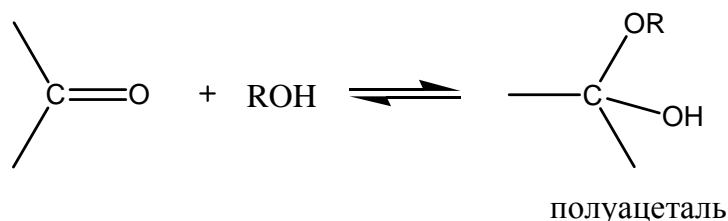
Конфигурации D- и L- не имеют отношения к знаку вращения плоскости поляризованного света, который определяется экспериментально.

Подавляющее большинство природных полисахаридов принадлежит к D-ряду. Редким исключением является L-арабиноза (альдопентоза).

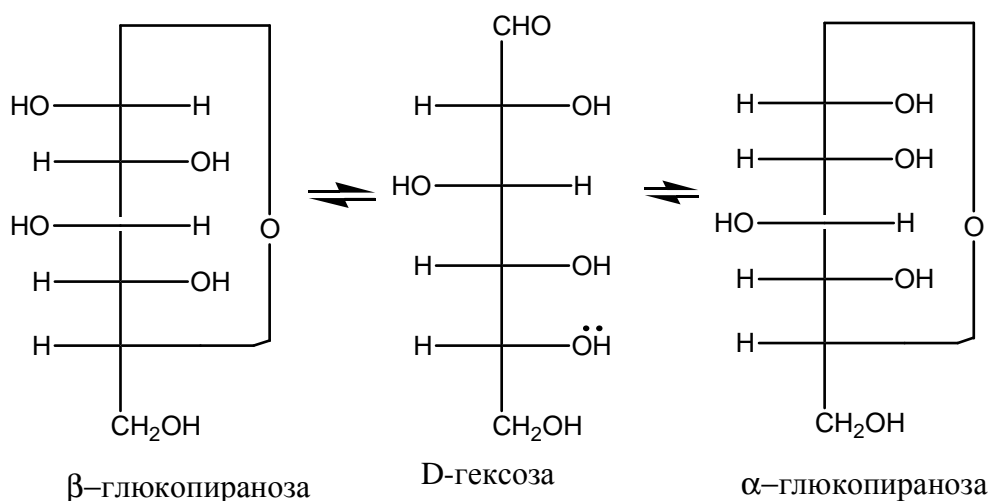
Циклические формы

В ряде реакций моносахаридов проявляется наличие C=O групп, а в других – нет, т.к. линейная форма моносахарида существует в равновесии с циклической. Причиной образования циклических форм являет-

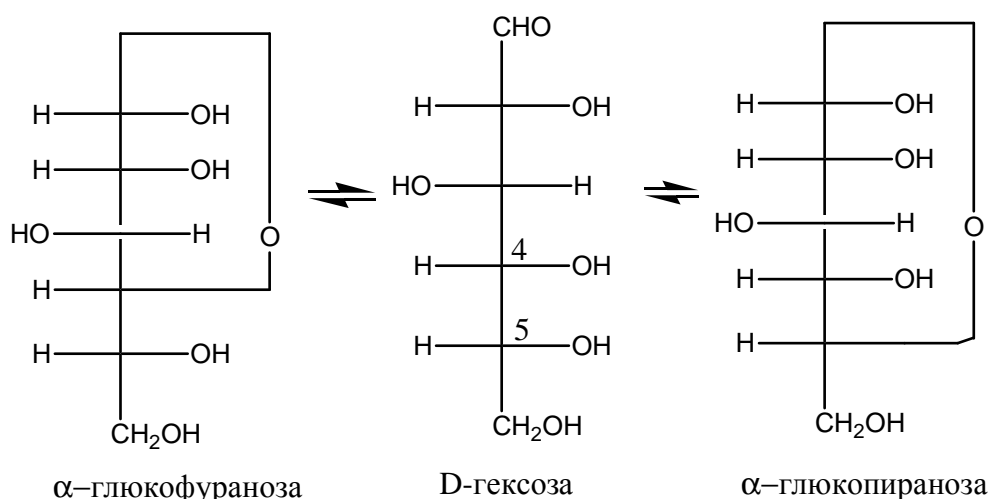
ся внутримолекулярная реакция между карбонильной группой и одной из гидроксильных групп альдопентоз и альдогексоз (преимущественно OH-группы при C₄ и C₅). Причина этих реакций – образование полуацеталей:



В результате этой реакции появляется новый хиральный центр при C₁. Новый хиральный центр называется аномерным, и соответственно стереоизомеры называются аномерами. У α-аномера конфигурация хирального центра совпадает с конфигурацией “концевого” центра при C₄ или C₅, а у β-аномера – противоположная:



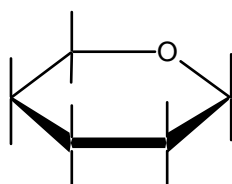
Если в реакцию вступает гидроксил у C₄, то образуется пятичленный цикл, называемый фуранозным, а если гидроксил у C₅, то образуется шестичленный цикл, называемый пиранозным:



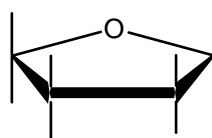
Аномеры являются диастереомерами и имеют различные физические и химические свойства.

Формулы Хеурса

Формулы Хеурса являются наиболее удобной формой записи моносахаридов. Циклы изображают в виде плоских многоугольников, лежащих перпендикулярно плоскости рисунка. В пиранозных циклах атом кислорода располагается в правом верхнем углу, а в фуранозных – за плоскостью рисунка:



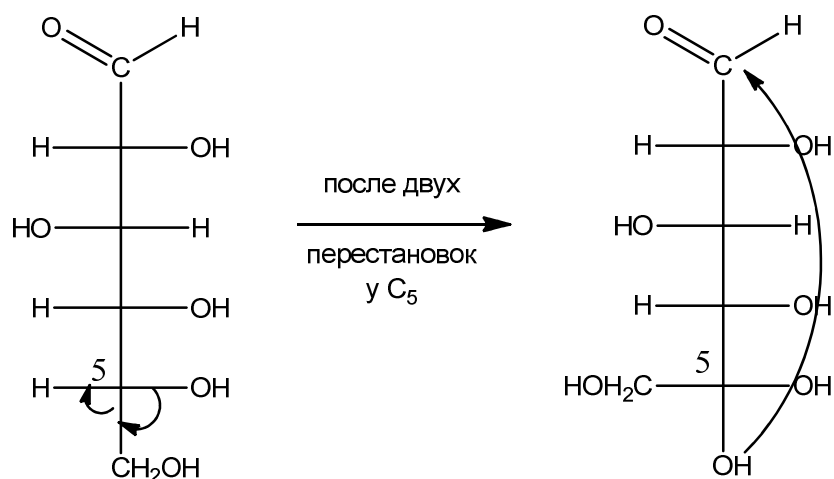
пиранозный цикл



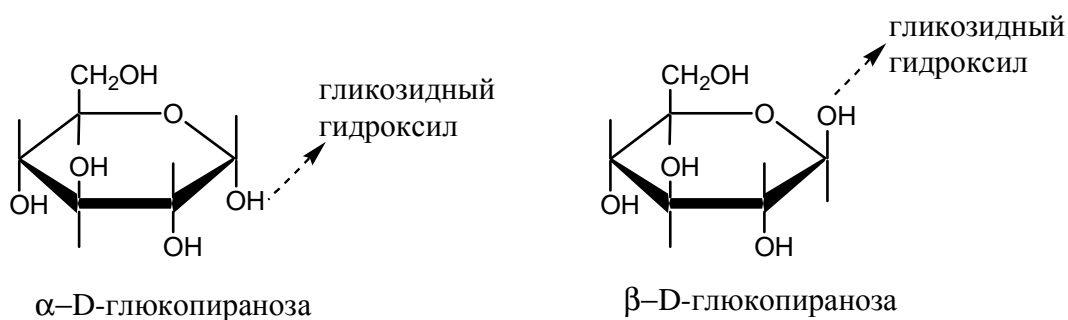
фуранозный цикл

Символы атомов углерода при написании формул часто опускают. Переход от проекционных формул Фишера к формулам Хеурса осуществляют по следующим правилам:

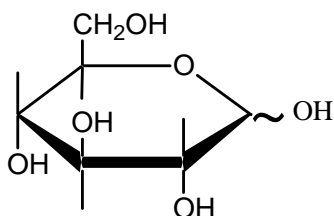
1. В проекции Фишера производят четное число перестановок при атоме углерода, гидроксильная группа которого образует цикл (C_4 или C_5). При четном числе перестановок сохраняется конфигурация:



2. Все заместители, находящиеся слева от линии углеродной цепи в формуле Фишера, располагают над плоскостью цикла в формуле Хеурса; соответственно заместители, находящиеся справа – под плоскостью. У альдогексоз D-ряда в пиранозной форме группа CH_2OH всегда располагается над плоскостью цикла, что служит формальным признаком D-ряда. Гликозидная группа OH у α -аномеров D-альдогексапираноз находится под плоскостью, у β -аномеров – над плоскостью:

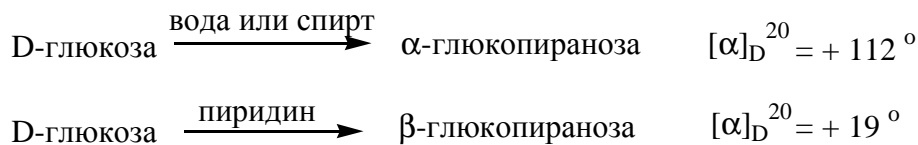


Когда нужно показать смесь аномеров, пишут так:



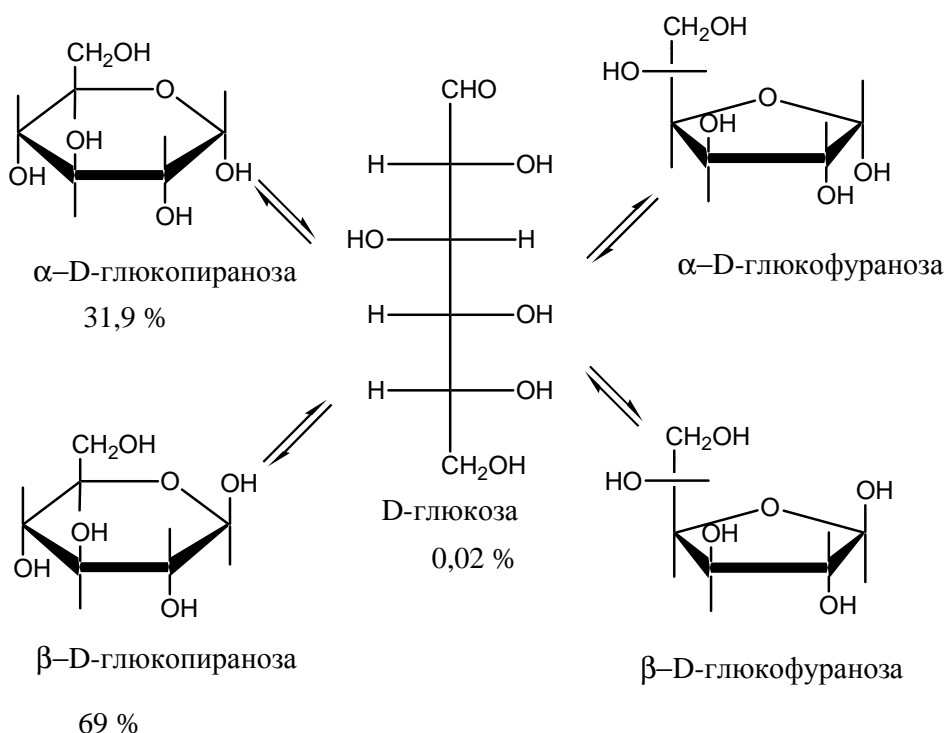
Таутомерия моносахаридов

В твердом состоянии моносахариды имеют циклическое строение. В зависимости от растворителя для перекристаллизации моносахарид может быть получен в виде α - или β -аномера пиранозной или фуранозной структуры. Например:



При стоянии свежеприготовленных растворов каждого из аномеров наблюдается постоянное изменение удельного вращения до величины $+52,5^{\circ}$. Это говорит о том, что происходит изомеризация α -формы в β -форму. Это явление называется мутаротацией.

Изомеризация осуществляется через промежуточное образование линейной формы. Такой тип изомеризации называется кольчато-цепной или цикло-оксо-таутомерией. Кроме того, в растворах присутствуют α - и β -аномеры фуранозной формы глюкозы:



Отсюда видно, что мутаротация связана с установлением равновесия между всеми формами D-глюкозы.

Аналогичные взаимопревращения происходят в водных растворах со всеми моносахаридами и с большинством известных дисахаридов.

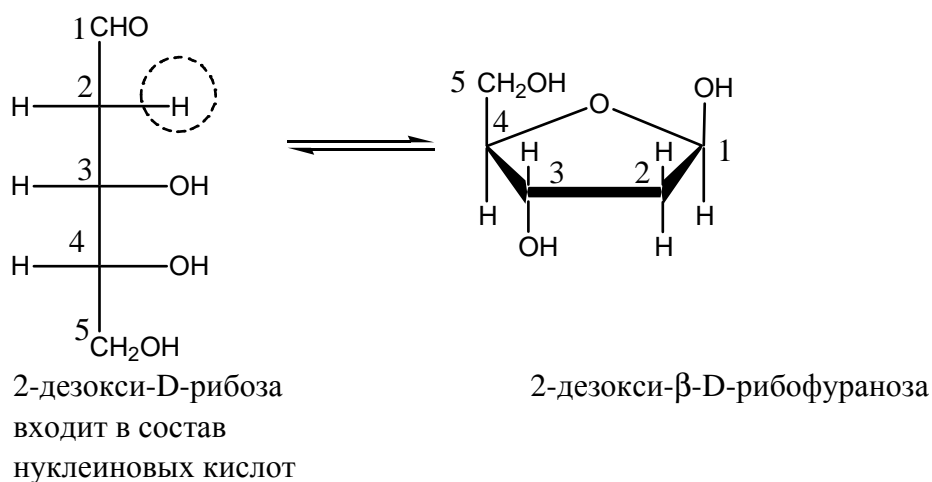
Например, D-фруктоза (кетогексоза) существует в растворе также в виде 5 форм, среди которых преобладают фуранозные изомеры.

Производные моносахаридов и их химические свойства

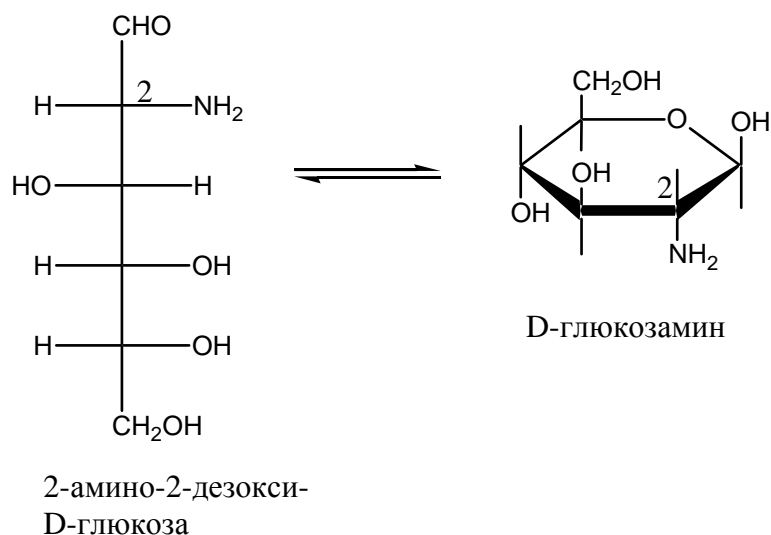
Моносахариды – твердые вещества, легко растворимые в воде, плохо – в спирте, и почти нерастворимые в эфире и других неполярных растворителях. Очень высокая растворимость в воде лежит в основе карамелизации сахаров – вода остается даже при нагревании. Большинство моносахаридов имеют сладкий вкус, но есть примеры, когда β-аномер D-маннопиранозы имеет горький вкус. В свободном виде в природе встречается преимущественно D-глюкоза. Она же является структурной единицей многих полисахаридов, например, крахмала, гликогена, целлюлозы. Другие моносахариды в большинстве своем входят в состав ди- или олигосахаридов. Например, D-галактоза входит в состав дисахарида лактозы, содержащейся в молоке, D-фруктоза – в дисахариде сахарозы.

К производным моносахаридов относят производные с замещенными OH-группами.

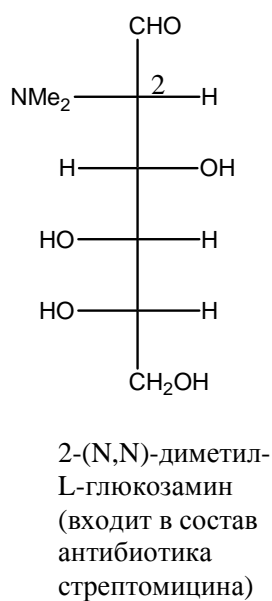
а) дезоксисахара – OH-группа в моносахариде замещена на водород



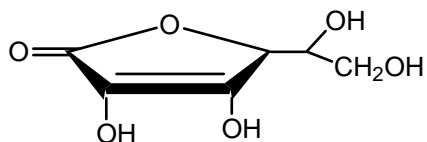
б) аминсахара (глюкозамины) – содержат аминогруппу (чаще всего в положении 2):



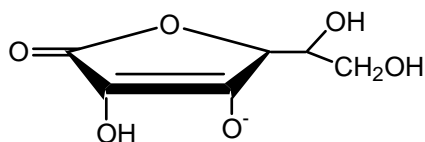
Аминогруппа может быть ацилирована остатками уксусной и других кислот. Встречаются и N-алкилированные глюкозамины:



в) аскорбиновая кислота (витамин С) – содержится в свежих овощах и фруктах:

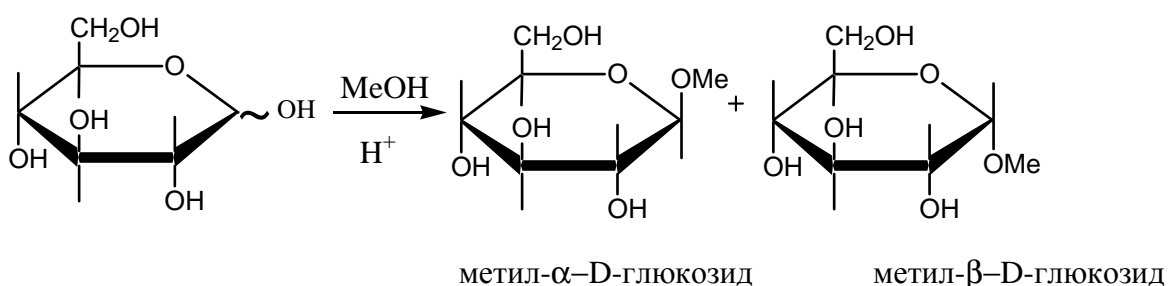


Аскорбиновая кислота проявляет заметные кислотные свойства ($pK_a = 4,2$) из-за диссоциации одной из OH-групп:

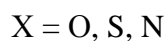
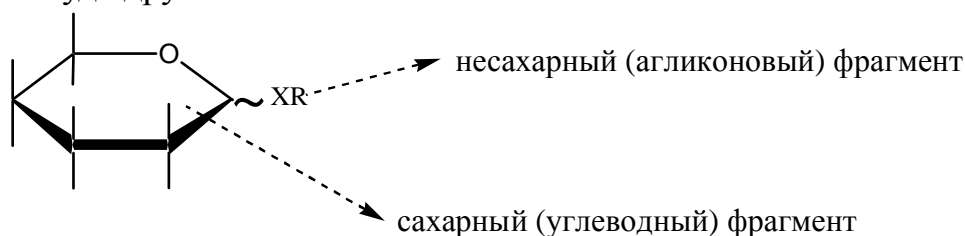


г) гликозиды

При взаимодействии моносахаридов с гидроксилсодержащими соединениями (спирты, фенолы и т.п.) в условиях кислотного катализа образуются производные циклической формы по гликозидной OH-группе: так называемый агликон (что означает “не содержащий сахара”) присоединяется к C₁ моносахарида через атом кислорода, поэтому более точно называть образующийся продукт O-гликозидом:



Помимо O-гликозидов, существуют другие типы гликозидов, в которых агликон присоединен к сахару не через атом кислорода, а через какой-нибудь другой атом:



O-гликозиды, N-гликозиды, S-гликозиды

Растворы гликозидов не мутаротируют.

Гликозиды устойчивы к щелочному гидролизу, но легко гидролизуются в кислотных условиях.

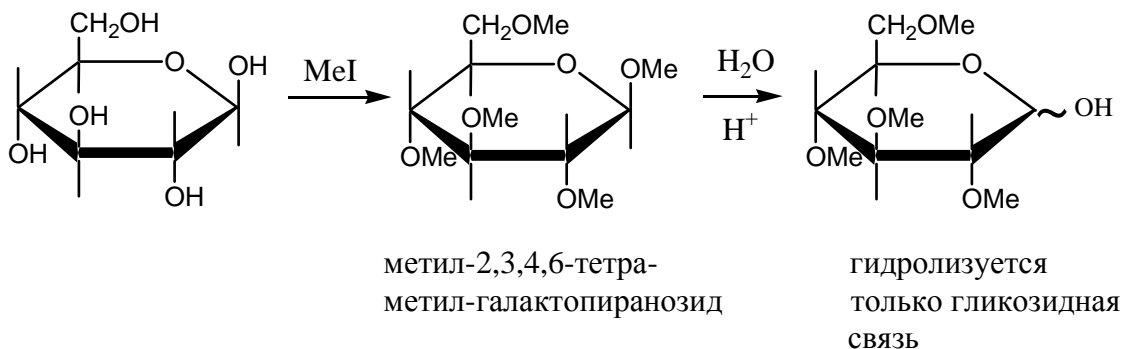
Широко используется ферментативный гидролиз гликозидов, преимущество которого состоит в высокой стереоспецифичности. Например, фермент α -гликозидаза расщепляет только α -гликозидную связь.

Гидролиз гликозидов – фундаментальный процесс в химии углеводов. Он лежит в основе гидролитического расщепления полисахари-

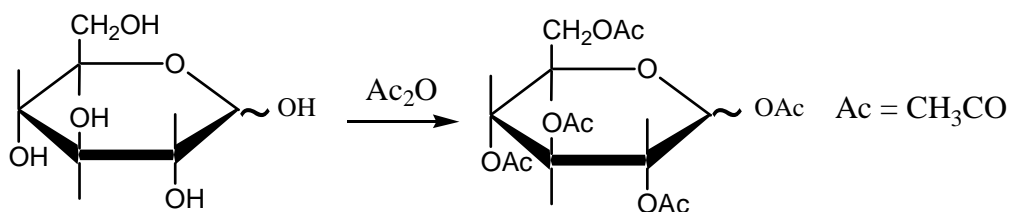
дов, осуществляемого в организме, а также используется во многих промышленных процессах.

д) простые и сложные эфиры

Простые эфиры получают действием обычных алкилирующих агентов (алкилгалогениды, алкилсульфаты), при этом алкилируются все OH-группы:

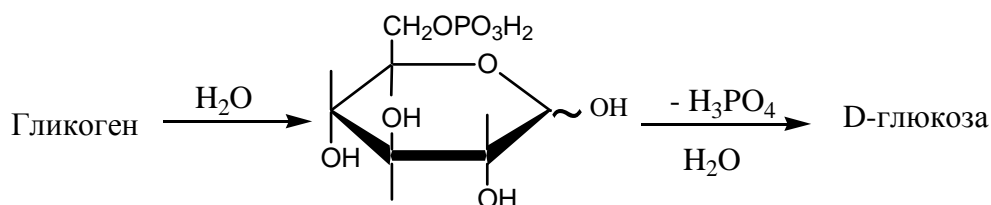


Сложные эфиры получают, например, ацилированием уксусным ангидридом:

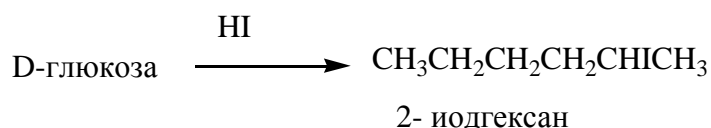
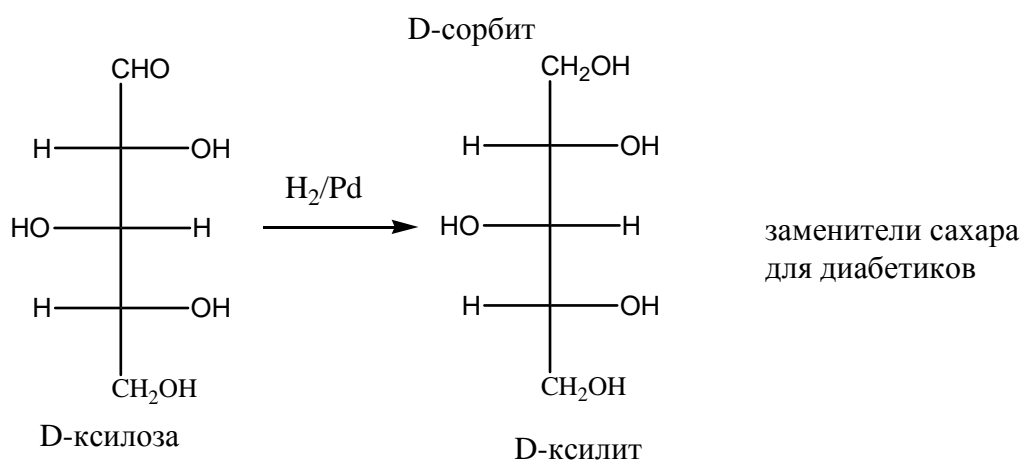
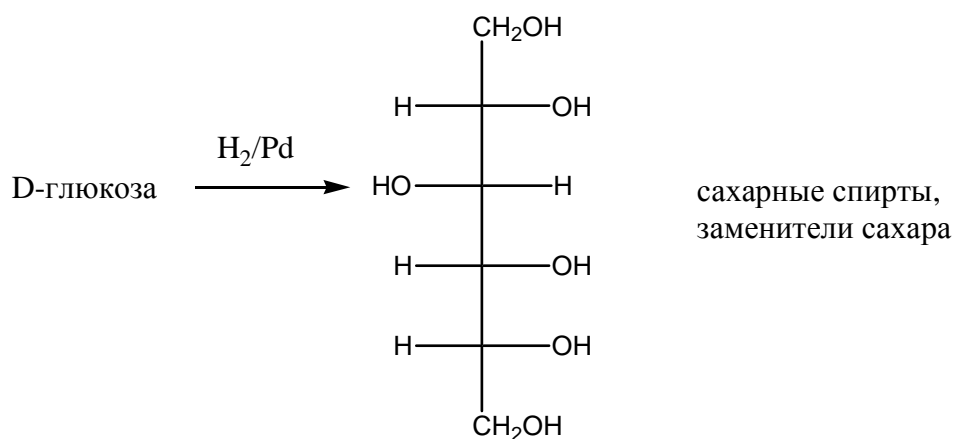


Они гидролизуются как в кислой, так и в щелочной среде.

Из сложных эфиров наибольшее значение имеют эфиры моносахаридов и фосфорной кислоты (фосфаты). Они содержатся во всех растительных и животных организмах. Фосфаты рибозы и дезоксирибозы являются структурными элементами нуклеиновых кислот и коферментов. Большое значение имеют фосфаты D-глюкозы и D-фруктозы – с их участием идут процессы метаболизма углеводов, фотосинтез, брожение и другие биологические процессы:



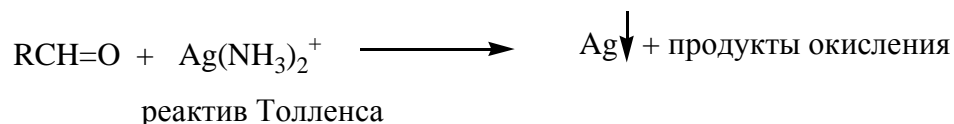
е) восстановление моносахаридов



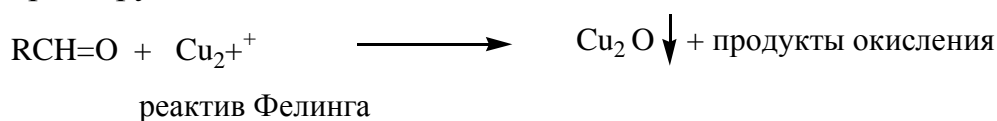
ж) окисление моносахаридов

Важные реакции, используемые в синтезе полезных продуктов и для анализа углеводов в биологических жидкостях. Окисление в щелочной среде сопровождается разрушением скелета, а в нейтральной и кислой – позволяет сохранить углеродный скелет.

Окисление в щелочной среде:

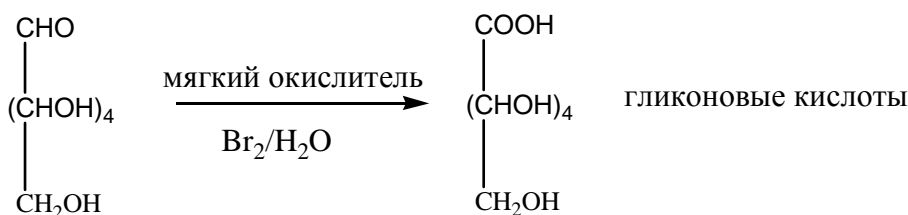
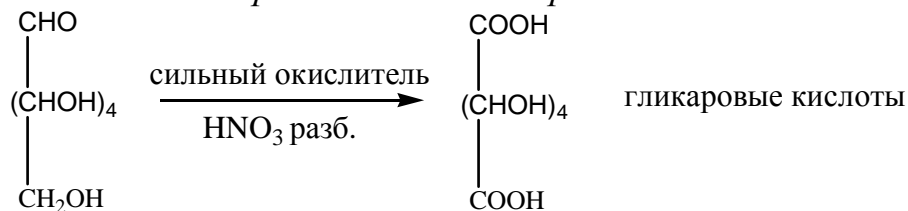


Также реагируют и кетозы.



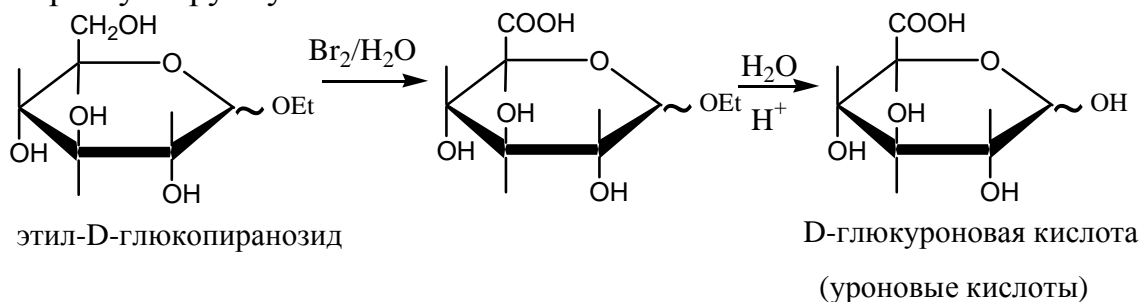
Моносахариды, дающие положительные реакции с этими реактивами, называются *восстанавливающими (редуцирующими)*. Гликозиды не дают реакции с этими реагентами.

Окисление в нейтральной и кислой среде:



В случае окисления D-глюкозы получают D-глюконовую кислоту, которая используется в медицине в виде солей (глюконат кальция).

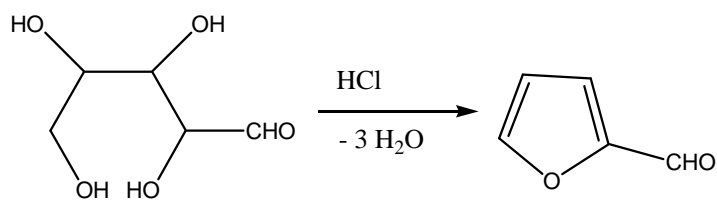
У гликозидов действием мягких окислителей окисляют первично-спиртовую группу:



Уроновые кислоты образуют пектиновые вещества плодов и ягод. Они выполняют важную биологическую функцию – выводят из организма токсичные вещества – конечные продукты распада белков и других соединений.

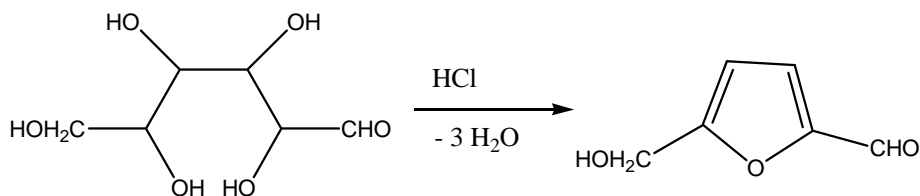
3) дегидратация

При нагревании моносахаридов с сильными минеральными кислотами (HCl) происходит отщепление воды с образованием производных фурфуурола:



альдопентоза

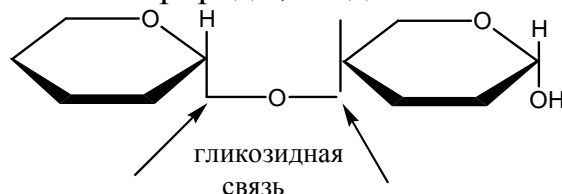
фурфурол



5-гидроксиметилфурфурол

Дисахариды

Дисахариды (биозы) состоят из двух моносахаридных звеньев одинаковой или различной природы, соединенных гликозидной связью:



Идеализированная схема дисахарида

В природе дисахаридов сравнительно немного:

мальтоза состоит из двух молекул D-глюкозы;

целлобиоза также состоит из двух молекул D-глюкозы;

лактоза состоит из молекулы D-глюкозы и молекулы D-галактозы;

сахароза состоит из молекулы D-глюкозы и молекулы D-фруктозы.

Дисахариды – это O-гликозиды, в которых вторая молекула моносахарида играет роль агликона.

Мальтоза, целлобиоза и лактоза восстанавливают реактивы Толленса и Феллинга и поэтому являются восстанавливающими сахарами. Сахароза не восстанавливает эти реактивы (это значит, что сахароза не содержит свободной альдегидной или кетонной группы), является невосстанавливающим сахаром и тем самым отличается от других дисахаридов.

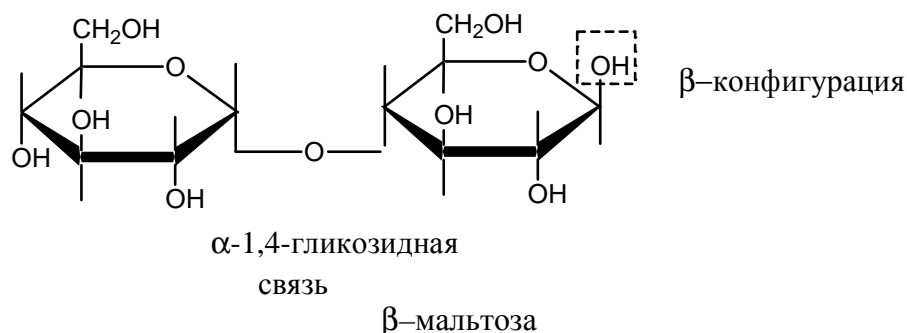
Существует два типа связывания двух молекул моносахаридов: 1) за счет гликозидного гидроксила одного моносахарида с любой OH-

группой другого (восстанавливающие); 2) за счет полуацетальных, гликозидных ОН-групп обоих углеводов (невосстанавливающие дисахариды).

Восстанавливающие дисахариды

В восстанавливающих дисахаридов вторая молекула моносахарида чаще всего участвует в образовании ацетальной функции за счет гидроксильных С₄, С₃ или С₆, а гликозидный гидроксил обязательно остается свободным. Его наличием и определяются восстанавливающие свойства этих дисахаридов и мутаротация их растворов.

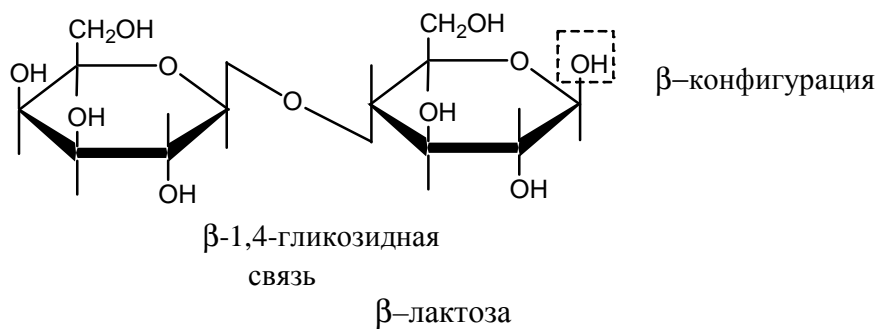
1. Мальтоза является основным продуктом гидролиза крахмала под действием амилазы – фермента, выделяемого слюнной железой. Своим названием мальтоза обязана тому, что она образуется и при ферментативном гидролизе крахмала, содержащегося в солоде (“malt”), почему ее и называют также солодовым сахаром:



Полное систематическое название β-мальтозы – О-α-D-глюкопиранозил-(1,4)-β-D-глюкопираноза.

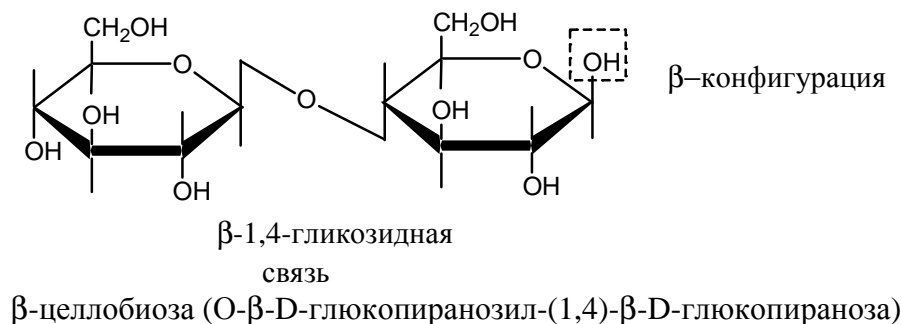
Мальтоза, подобно моносахаридам, вступает в обычные реакции карбонильных соединений: дает реакцию “серебряного зеркала” с реактивом Толленса и красный осадок с раствором Феллинга.

2. Лактоза (молочный сахар) образуется в молочных железах. Ее содержание в молоке млекопитающих достигает 5%. В промышленных масштабах лактозу получают из молочной сыворотки:



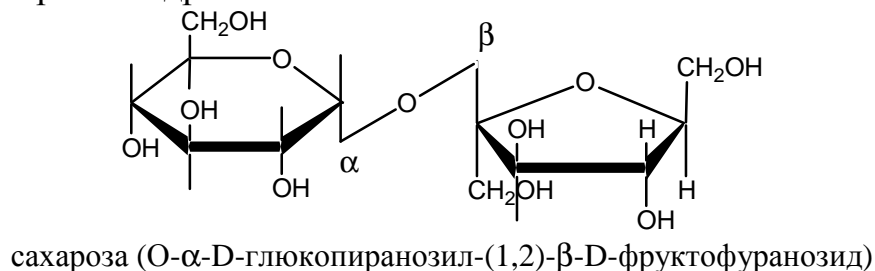
Полное название β -лактозы – β -D-галактопиранозил-(1,4)- β -глюкопираноза. Встречается также и α -лактоза.

3. Целлобиоза. Если целлюлозу в течение нескольких дней обрабатывать серной кислотой и уксусным ангидридом, то одновременно протекают реакции ацетилирования и гидролиза и получается октаацетат целлобиозы. Щелочной гидролиз октаацетата дает целлобиозу. Так же как и мальтоза, она состоит из остатков D-глюкозы, только соединяется β -гликозидной связью:



Невосстанавливающие дисахариды

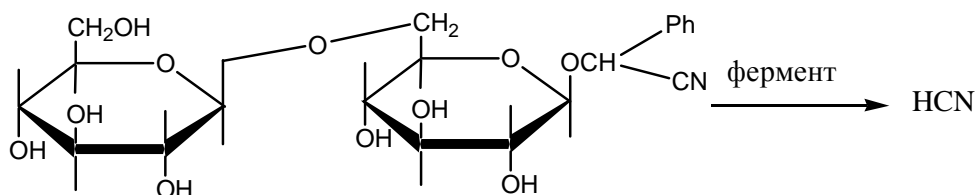
Сахароза (тростниковый или свекловичный сахар) – находится в сахарной свекле или сахарном тростнике, до 28% от сухого вещества. В состав сахарозы входит D-глюкоза в пиранозной форме и D-фруктоза в фуранозной форме. Гликозидная связь между ними образуется за счет двух аномерных гидроксильных групп:



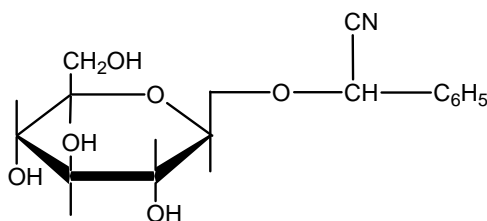
В отличие от мальтозы, лактозы и целлобиозы, сахароза не существует в виде α - и β -форм, легко превращающихся друг в друга, т.е. не подвергается мутаротации, не окисляется реактивом Феллинга, т.к. отсутствует карбонильная группа, при гидролизе образует смесь D-глюкозы и D-фруктозы, которая называется инвертным сахаром. Инвертный сахар – более сладкий, чем сахароза, т.к. фруктоза ~ на 50% слаще сахарозы.

Биозные фрагменты природных гликозидов. Аминогликозиды-антибиотики

В природе встречаются довольно простые гликозиды, состоящие из дисахаридов, связанных с агликоном. Наибольший интерес представляют амигдалин, выделенный из горького миндаля, и стрептомицин. Амигдалин является гликозидом гентиобиозы, присоединенной к агликону – циангидрину бензальдегида:

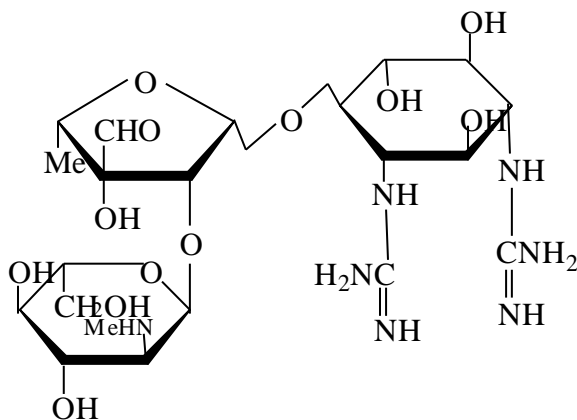


Из амигдалина было получено соединение, которое приобрело широкую известность в США под названием летрила:



В течение многих лет его применяли для лечения рака, однако антиканцерогенная активность этого препарата не доказана. Кроме того, его называют витамином В-17, хотя доказательства в пользу этого утверждения не были получены.

Стрептомицин – это антибиотик, подавляющий синтез белка. Он представляет собой гликозид, агликоном которого служит производное инозита (гексаоксициклогексана) с двумя оксигруппами, замещенными гуанидиновыми остатками:



Полисахариды (гликаны)

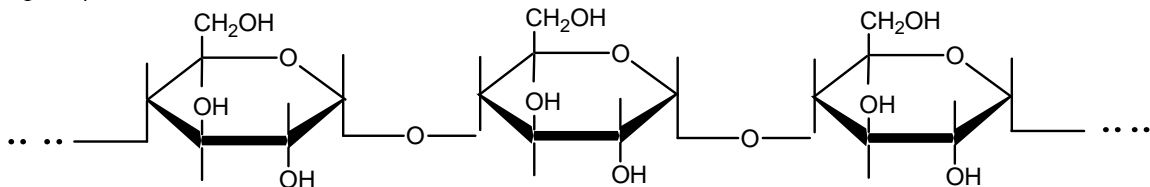
Полисахариды – высокомолекулярные углеводы, полигликозиды, обязательно содержат одну гликозидную C_1 связь. Полисахариды растительного происхождения, как правило, включают связи 1–4, и 1–6, а бактериального и животного происхождения имеют гликозидные связи 1–3, и 1–2. На конце цепи имеется звено со свободной гликозидной группой OH , но поскольку таких остатков мало, то эти углеводы проявляют очень слабые восстанавливающие свойства.

Различают гомополисахариды, которые состоят из одного моносахарида, и гетерополисахариды, состоящие из моносахаридов различной природы.

Известны гомополисахариды растительного происхождения – это крахмал, целлюлоза, амилопектин, и др.; животного – хитин, гликоген и др., а также бактериального происхождения – например, декстраны.

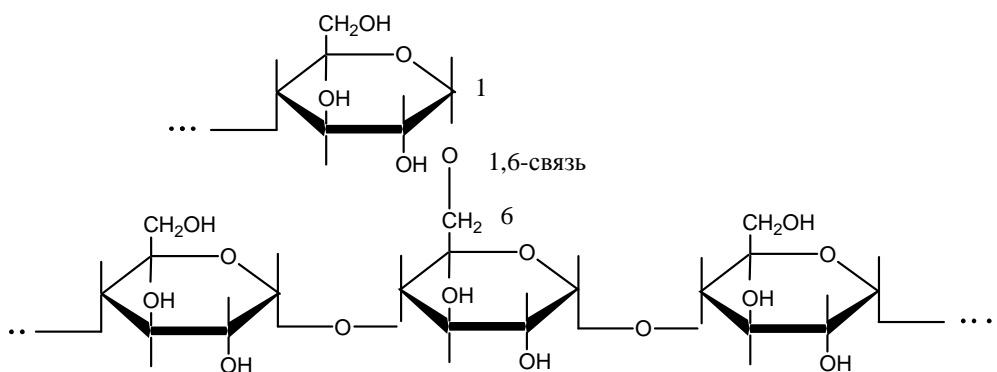
Гомополисахариды

1. Крахмал представляет собой основной источник резервной энергии в растительных клетках. Он встречается в виде крахмальных гранул, которые содержат две основные фракции – амилозу (около 20%) и амилопектин (около 80%). Амилоза представляет собой неразветвленную цепь, состоящую из остатков D-глюкозы, связанных по типу связи C_1-C_4 :



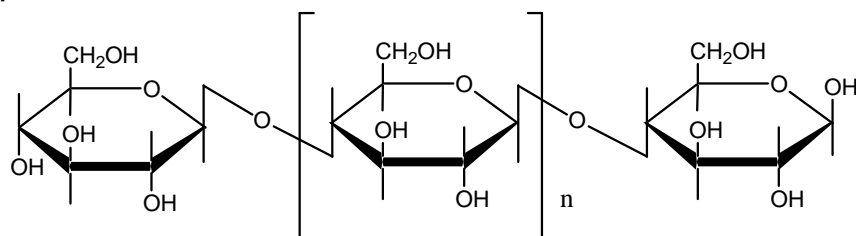
Амилоза имеет в своем составе 60–300 остатков глюкозы. Она растворима в горячей воде и с йодом дает синее окрашивание.

Амилопектин представляет собой весьма разветвленную структуру, также состоящую из остатков глюкозы. Разветвленность достигается образованием связей как между C_1 и C_4 , так и между C_1 и C_6 :



Структура крахмала представлена остатками D-глюкозы, соединенными в основном связями 1–4 и в меньшей степени 1–6. Количество глюкозных остатков исчисляется несколькими тысячами. Эмпирическая формула крахмала $(C_6H_{10}O_5)_n$, где n – количество остатков глюкозы. При быстром нагревании крахмал за счет содержащейся в нем влаги гидролизует на более мелкие осколки, называемые декстринами. Этот процесс имеет место при хлебопечении. Декстрины легче усваиваются организмом, чем крахмал.

2. Целлюлоза – наиболее распространенный растительный полисахарид. Древесина на 50–70% состоит из целлюлозы, хлопок – почти чистая целлюлоза. Целлюлоза имеет линейное строение и состоит из остатков β -D-глюкозы:



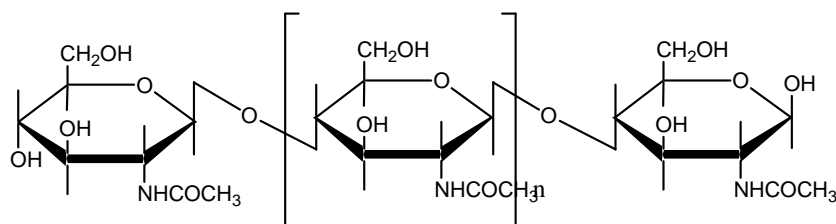
β -Гликозидные связи в целлюлозе не гидролизуются в организмах многих животных, включая человека, хотя α -гликозидные связи амилозы расщепляются: столь высока специфичность ферментов! Однако многие микроорганизмы разрушают целлюлозу. Такие микробы встречаются в почве и в кишечном тракте животных (жвачные).

Большое значение имеют производные целлюлозы. Например, метоцель – производное целлюлозы, содержащее небольшое количество метилированных оксигрупп – применяется при изготовлении лаков, эмалевых красок, упаковочных пленок, загустителей шампуней и т.д. Ацетат целлюлозы – ацетатное волокно, нитроцеллюлоза – взрывчатое вещество, применяют для производства пороха.

4. Гликоген – основной запасной углевод организма человека и животных, который часто называют животным крахмалом. По своей

структуре гликоген напоминает амилопектин, но разветвлен сильнее. Молекулярная масса гликогена составляет от 10^6 до 10^8 . Он содержит от 6 тыс. до 1 млн. глюкозных остатков. Гликоген образуется практически во всех клетках организма, однако наибольшая концентрация обнаруживается в печени – от 2 до 6%, и в мышцах – от 0,5 до 2%. Поскольку общая масса мышц велика, большая часть всего гликогена находится в мышцах.

5. Хитин по своей структуре близок целлюлозе и отличается от нее тем, что в нем в каждом звене целлюлозы одна группа $-OH$ заменена на группу $-NHCOCH_3$. Таким образом, хитин относится к аminosахарам или N-ацетилглюкозаминам:

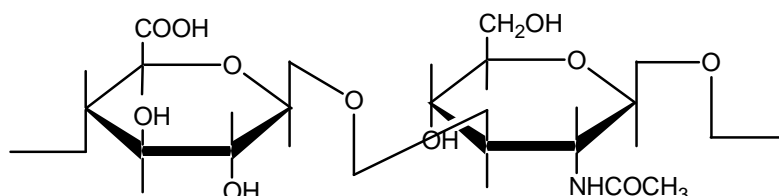


Хитин входит в состав панцирей ракообразных и насекомых. По мере роста ракообразные периодически сбрасывают его во время линьки, т.к. в отличие от тканей, увеличивающихся в результате клеточного деления, жесткий полимер сохраняет постоянные размеры. Клеточные стенки грибов также построены из хитина. Хитин не только выполняет опорные функции, но и играет роль кожицы, регулирующей поступление или потерю воды.

Гетерополисахариды

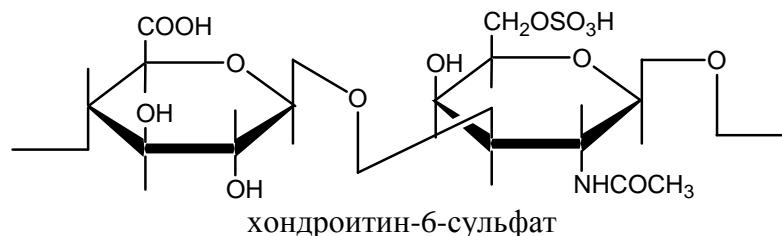
Гетерополисахариды являются основой полисахаридов соединительных тканей: кожи, хрящей, сухожилий, роговицы глаза, стекловидного тела и т.д. Чаще всего они построены из повторяющихся дисахаридных единиц. В их состав входят гексуроновые кислоты (чаще глюкуроновая кислота) и N-ацетилпроизводные глюкозамина или галактозамина.

1. Гиалуроновая кислота построена из повторяющейся единицы, включающей глюкуроновую кислоту и N-ацетилглюкозамин:



Молекулярная масса гиалуроновой кислоты достигает нескольких миллионов (20–30 тыс. мономеров в молекуле). Гиалуроновая кислота в некоторых органах находится в свободном виде, например, в стекловидном теле глаза и в суставной жидкости.

2. Хондроитинсульфаты содержат повторяющуюся единицу из глюконовой кислоты и сульфированного N-ацетилгалактозамина:



Существует два вида хондроитинсульфатов: хондроитин А содержит сульфатную группу при атоме С₄ аминсахара, а хондроитин С – при С₆. молекулярная масса хондроитинсульфатов лежит в пределах 10–60 тыс., они входят в состав соединений, содержащих белок, и называемых протеогликанами.

К протеогликанам относят и гепарин, в состав которого входит глюконовая кислота и сульфированный N-ацетилглюкозамин, который препятствует свертыванию крови, поэтому его используют как антикоагулянт при переливании крови и профилактическое средство против тромбозов.

Раздел 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры с молекулярной массой до десяти миллионов, которые в результате гидролиза дают эквимолекулярную смесь гетероциклических аминов, пентозы и фосфорной кислоты. Они играют главную роль в передаче наследственных признаков (генетической информации) и управлении процессом биосинтеза белка. Впервые были выделены швейцарским биологом Ф. Мишером (1869 г.) из ядер клеток.

Нуклеиновые кислоты относят к одному из двух классов: РНК (рибонуклеиновая кислота) и ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – при полном гидролизе РНК образуется пентоза D-рибоза, а при гидролизе ДНК образуется 2-дезокси-D-рибоза. Неполный гидролиз нуклеиновых кислот дает нуклеотиды, которые могут быть гидролизованы до фосфорной кислоты и нуклеозидов. При гидролизе нуклеозида получают гетероциклический амин (или нуклеиновое основание) и соответствующую пентозу.

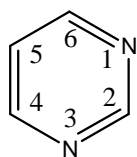
Длина молекул ДНК в клетках человека достигает нескольких сантиметров. Возможно, что ДНК каждой хромосомы представляет собой единую гигантскую молекулу или небольшое число таких молекул. Общая длина ДНК в 23 парах хромосом человека равна примерно 1,5 м. Клетки бактерий часто содержат единственную молекулу ДНК. Молекулы РНК короче: длина их обычно не превышает 0,01 мм.

Основная часть ДНК находится в ядре клетки; небольшое количество ДНК имеется в митохондриях (около 0,2 % от всей клеточной ДНК). РНК отличаются большим разнообразием молекул и обнаруживаются во всех частях клетки.

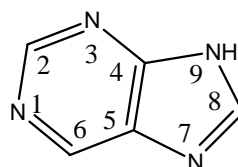
Структурные элементы нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты состоят из последовательности химически связанных структурных единиц – нуклеотидов. Каждый нуклеотид построен из трех компонентов: фосфорной кислоты, моносахарида пентозы и гетероциклического азотистого основания – производного пиримидина или пурина.

Азотистые основания

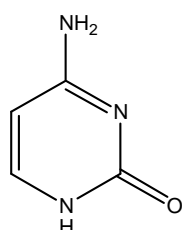


пиримидин

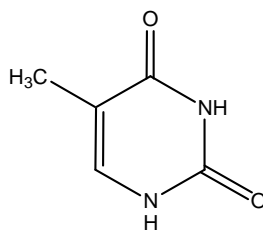


пурин

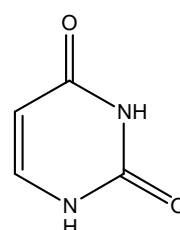
Пиримидиновые основания, представленные в нуклеиновых кислотах следующие:



цитозин (C)

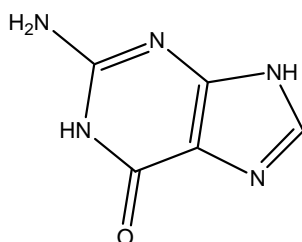


тимин (T)

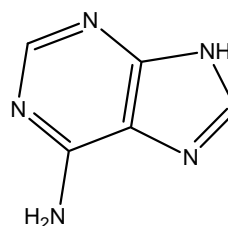


урацил (U)

Пуриновые основания, представленные в нуклеиновых кислотах – это



гуанин (G)



аденин (A)

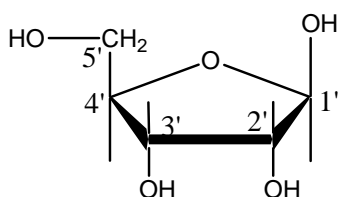
Три из этих оснований – аденин (A), гуанин (G) и цитозин (C) типичны как для ДНК, так и для РНК. Тимин (T) входит только в состав ДНК, а урацил (U) – только в РНК.

В состав каждой нуклеиновой кислоты входят четыре основания, таким образом:

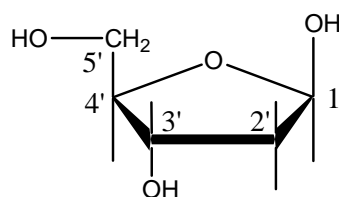
ДНК содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и тимин (T)

РНК содержит аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U)

Моносахарид пентоза. В нуклеиновых кислотах представлены пятичленные сахара



D-рибоза
(β-D-рибофураноза)
входит в состав РНК

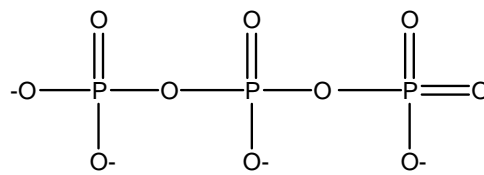
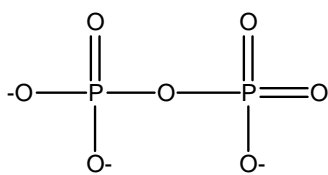
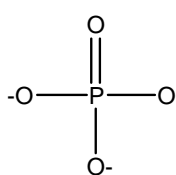


D-дезоксирибоза
(β-D-дезоксирибофураноза)
входит в состав ДНК

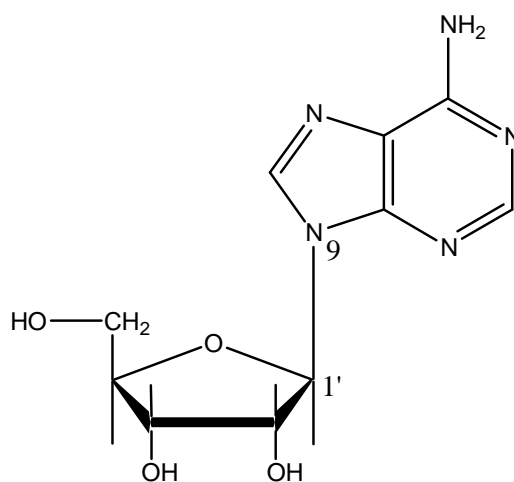
Чтобы избежать путаницы между нумерацией азотистых оснований и пентоз, атомы углерода в пентозах нумеруются со штрихом.

Фосфатные группы. – остатки фосфорной кислоты, находящиеся в виде анионов: именно они придают всей структуре кислотные свойства.

Фосфатные группы могут быть моно-, ди- или трифосфатными:

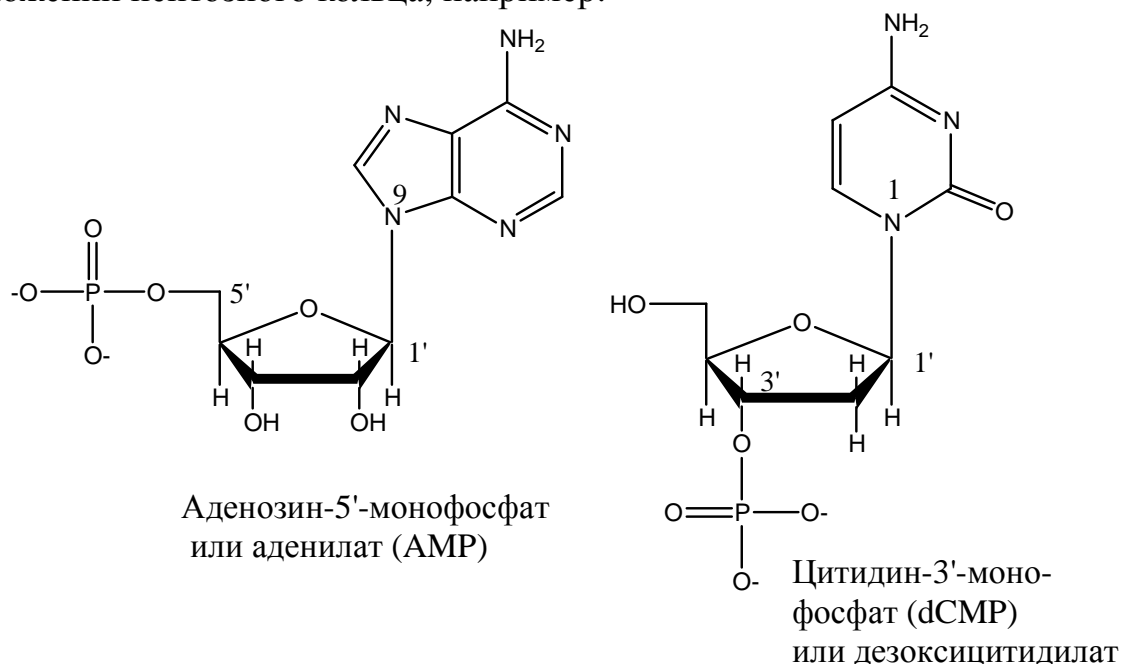


Соединения основания и пентозы называют **нуклеозидом**. Связь (β-гликозидная) образована первым атомом углерода пентозы (С-1') в пиримидиновых нуклеозидах (N-1) и девятым атомом азота (N-9) в пуриновых нуклеозидах:



аденозин

Нуклеотиды представляют собой нуклеозидмонофосфаты, при этом фосфатная группа в нуклеотидах может находиться в 5' или 3' положении пентозного кольца, например:



Отщепление фосфатной группы от нуклеотида приводит к соответствующему нуклеозиду. Тривиальные названия нуклеозидов являются производными от соответствующих азотистых оснований: для пиримидиновых имеют окончание “идин”, для пуриновых – “озин”. Префикс “дезокси” или d применяется для обозначения соединений, содержащих остаток дезоксирибозы. Наиболее распространенные нуклеозиды и нуклеотиды представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1. Номенклатура наиболее распространенных нуклеозидов и нуклеотидов

нуклеозид	нуклеотид	Сокращенные обозначения моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов
<i>Рибонуклеозиды</i>	<i>Рибонуклеотиды</i>	
Аденозин	Аденозин-3'- или 5'- моно-фосфат Аденилат	AMP, ADP, ATP
Гуанозин	Гуанозин-5'(3')- монофосфат Гуанилат	GMP, GDP, GTP

Цитидин	Цитидин-5'(3')-фосфат Цитидилат	СМР, СDP, СТР
Уридин	Уридин-5'(3')-фосфат Уридилат	UМР, UDP, UTP
<i>Дезоксирибо- нуклеозиды</i>	<i>Дезоксирибонуклеотиды</i>	
Дезоксиаденозин	Дезоксиаденозин-3'- или 5'-монофосфат Дезоксиаденилат	dAMP, dADP, dATP
Дезоксигуанозин	Дезоксигуанозин-5'(3')- монофосфат Дезоксигуанилат	dGMP, dGDP, dGTP
Дезоксицитидин	Дезоксицитидин-5'(3')- фосфат Дезоксицитидилат	dCMP, dCDP, dCTP
Тимидин*	Тимидин-5'(3')-фосфат Тимидилат*	dTMP, dTDP, dTTP

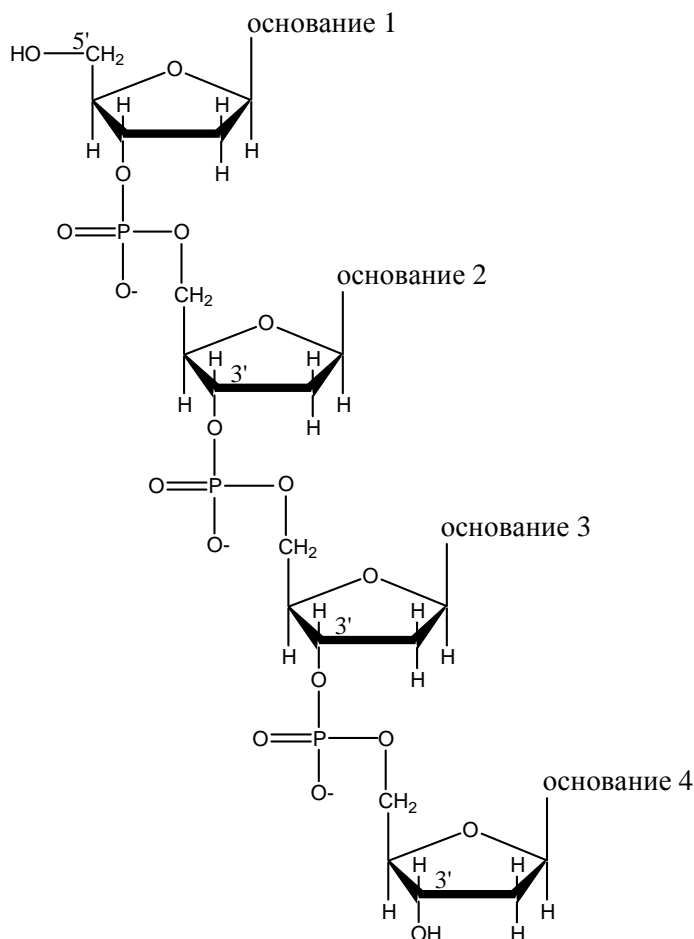
* – отсутствие приставки “дезокси” связано с тем, что тимин встречается исключительно в дезоксирибонуклеотидах, однако в сокращенных обозначениях приставка “d” сохраняется.

Дезоксирибонуклеотиды в организме используются для образования ДНК. Функции рибонуклеотидов более разнообразны. Основная их масса расходуется на образование РНК. Кроме того, рибонуклеотиды выполняют роль коферментов в некоторых трансферазных реакциях (в частности, при синтезе полисахаридов). Адениловые рибонуклеотиды входят в состав коферментов НАД, НАДФ, ФАД, КоА.

Первичная структура нуклеиновых кислот

При действии ферментов, относящихся к группе нуклеаз (РНКазы, ДНКазы), полинуклеотиды (ДНК и РНК) образуются путем конденсации мономеров – мононуклеотидов, которые соединены между собой по типу 5'-3'-связи – т.е. соединение происходит путем образования сложноэфирных связей между остатком фосфорной кислоты одного мононуклеотида и двумя гидроксильными группами, одной, находящейся у 3' углеродного атома пентозы (рибозы или дезоксирибозы) одного нуклеотида и 5' углеродного атома пентозы следующего нуклеотида. Следует отметить, что последовательность нуклеотидов имеет направление или

полярность, обусловленную тем обстоятельством, что на одном конце цепи имеется свободная гидроксильная группа при С-5' (5'-конец), а на другом – свободная 3'-ОН-группа (3'-конец):



Разные нуклеиновые кислоты отличаются друг от друга числом мононуклеотидов в молекуле, нуклеотидным составом и порядком чередования нуклеотидных остатков (фактически оснований, поскольку пентозофосфатные части у всех мономеров одинаковы). Для краткого изображения первичной структуры нуклеиновых кислот используют однобуквенные символы нуклеотидов: А – аденин, Г – гуанин, С – цитозин, У – урацил, Т – тимин.

Первичная структура РНК может быть представлена, например, такой записью:



Запись структуры ДНК отмечается приставкой “d” (дезокси-):



d(ATAAGTCCGATTAC)

[эти две записи, помимо символа “d”, различаются еще и тем, что в первой записи (РНК) не встречается символ Т, а во второй (ДНК) не встречается символ U].

При такой записи предполагается, что слева находится 5'-конец, справа – 3'-конец. Иногда приходится писать полинуклеотидную цепь противоположным образом; в этом случае во избежание путаницы вводят дополнительные приставки

(5'→3') AUAAGC.....

здесь 5'-конец слева;

(3'→5') AUAAGC.....

здесь 5'-конец справа.

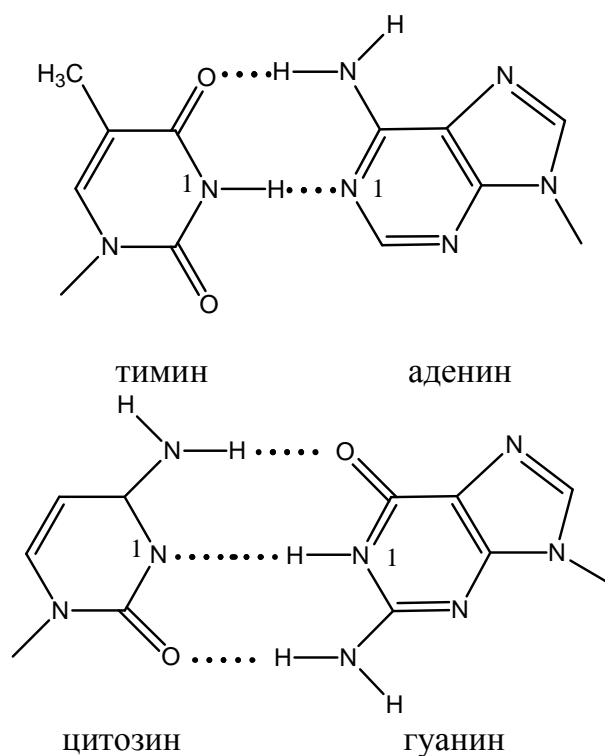
Из четырех разных нуклеотидов можно построить огромное количество нуклеиновых кислот, различающихся по первичной структуре. В этом отношении нуклеиновые кислоты сходны с белками.

Вторичная структура ДНК

Особенностью нуклеотидного состава ДНК является то, что число адениловых нуклеотидов равно числу цитидиловых: $A=T$, $G=C$, следовательно, $A+G=T+C$, т.е. число пуриновых нуклеотидов равно числу пиримидиновых (правила Чаргаффа). Такие соотношения не свойственны РНК.

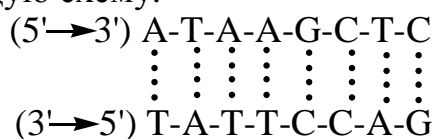
Исходя из правил Чаргаффа о нуклеотидном составе ДНК и из рентгеноструктурных исследований, Джеймс Уотсон, Фрэнсис Крик и Морис Уилкинс (Великобритания) предложили модель строения ДНК (1953 г.). Ниже сформулированы основные черты этой модели.

1. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно и на всем протяжении связанных друг с другом водородными связями (каждый из мононуклеотидов участвует в образовании водородных связей).
2. Водородные связи между цепями образуются за счет специфического взаимодействия аденинового остатка одной цепи с тиминным остатком другой цепи (пара А...Т) и гуанинового остатка одной цепи с цитозинным остатком другой цепи (пара С...G):



Основания, образующие пару, комплементарны друг другу в том смысле, что между ними легче возникают водородные связи, чем при других сочетаниях, (например, А и G, А и С и др.); это объясняется геометрией расположения групп, участвующих в образовании водородных связей между парами оснований, и геометрией молекулы ДНК в целом.

3. Первичная структура одной цепи молекулы ДНК комплементарна первичной структуре другой цепи. Это легко понять, рассматривая следующую схему:



Если в положении n (считая с 5'-конца) первой цепи находится остаток дезоксиаденилата (А), то в положении n (считая с 3'-конца) второй цепи находится комплементарный ему остаток тимидилата (Т), а не какой-либо другой мономер. Таким образом, если известна первичная структура одной цепи молекулы ДНК, то первичная структура другой цепи может быть легко написана исходя из правил комплементарности оснований и комплементарности цепей, иначе говоря, что одна цепь является *матрицей* для

другой. Следует отметить, что комплементарность цепей не означает идентичности их первичных структур.

4. Обе цепи закручены в спираль, имеющую общую ось; цепи могут быть разделены только путем раскручивания. Пуриновые и пиримидиновые основания обращены внутрь спирали; их плоскости перпендикулярны оси спирали и параллельны друг другу, так что получается стопка оснований. Между основаниями в этой стопке возникают гидрофобные взаимодействия, вносящие основной вклад в стабилизацию двойной спирали, больший, чем водородные связи между цепями. Пентозофосфатные части располагаются по периферии, образуя ковалентный остов спирали.

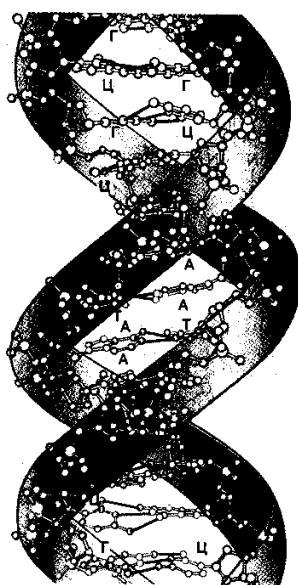


Рис. 5.1. Модель фрагмента ДНК

Структура ДНК позволяет объяснить молекулярный механизм фундаментальных биологических явлений, таких как самовоспроизведение организмов, наследственность, изменчивость. Установление структуры ДНК – одно из выдающихся событий науки 20 века. В 1962 году Джеймс Уотсон, Фрэнсис Крик и Морис Уилкинс получили Нобелевскую премию за установление структуры ДНК.

Вторичная структура РНК

Молекулы РНК в отличие от ДНК построены из одной полинуклеотидной цепи. Однако в этой цепи имеются комплементарные друг другу участки, которые могут взаимодействовать, образуя двойные спирали. При этом соединяются нуклеотидные пары А...У G...С. Такие спирализованные участки (их называют шпильками) обычно содержат

небольшое число нуклеотидных пар (до 20-30) и чередуются с неспирализованными участками (рис. 5.2):

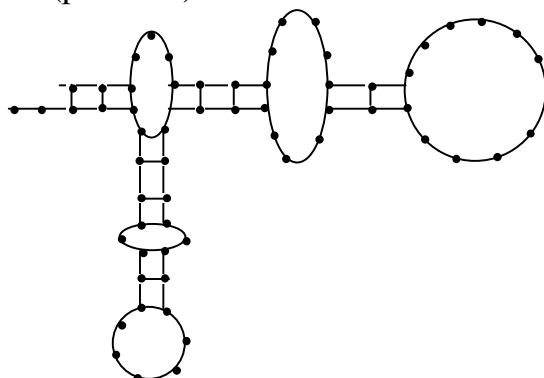


Рис. 5.2. Вторичная структура РНК

По особенностям структуры и функций различают три основных типа РНК: *рибосомные РНК* (р-РНК), *транспортные РНК* (т-РНК) и *матричные РНК* (м-РНК). Матричные РНК составляют около 2 % от всей РНК клетки. Матричные РНК называют также информационными РНК (и-РНК). Количество и-РНК соответствует количеству разных белков в клетке.

Биосинтез нуклеиновых кислот и белков

(матричные биосинтезы)

Первичную структуру важнейших биополимеров – белков и нуклеиновых кислот – можно сравнить с буквенной записью: и в том, и в другом случае имеется не произвольное, а строго определенное, “имеющее смысл” чередование элементов – мономеров или букв. На этом основании нуклеиновые кислоты и белки называют информационными молекулами. Чтобы получить такие молекулы, недостаточно смешать мономеры и обеспечить условия образования пептидной или фосфодиэфирной связи, необходима еще программа, определяющая последовательность присоединения разных мономеров к растущей цепи полимера. При биосинтезе новых молекул нуклеиновых кислот и белков носителями такой программы являются нуклеиновые кислоты; в этой роли их называют *матрицами*. Матрица в ходе матричного синтеза не расходуется и может использоваться многократно; в этом отношении она сходна с катализатором.

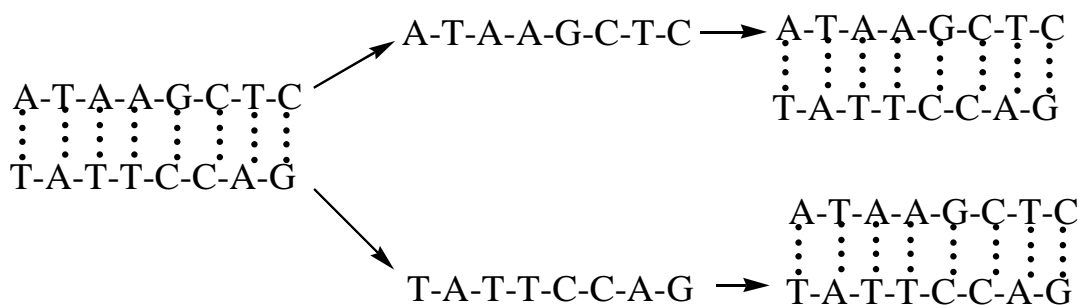
Различают три основных типа матричных биосинтезов:

1) биосинтез ДНК (репликация ДНК) с использованием в качестве матрицы уже существующих молекул ДНК;

- 2) биосинтез РНК на матрице ДНК (транскрипция);
- 3) биосинтез белков с использованием в качестве матрицы РНК (трансляция).

Репликация ДНК

Структура двойной спирали ДНК позволяет представить простой механизм репликации: две цепи ДНК, образующие спираль сначала раскручивается за счет разрыва водородных связей между комплементарными основаниями, цепи расходятся, а затем каждая одноцепочечная половина молекулы ДНК достраивается до целой, двухцепочечной молекулы. При этом каждая цепь служит матрицей, к которой путем спаривания оснований подстраивается комплементарная цепочка. При этом свободные нуклеотиды поступают из клеточных органелл (рибосом), фермент ДНК-полимераза связывает их в фосфатно-пептидный остов, а азотистые основания этих нуклеотидов комплементарно связываются с матричными азотистыми основаниями:



Таким образом, из каждой исходной молекулы ДНК получаются две копии с идентичной структурой. Т.е. образование пар оснований составляет химическую основу считывания биологической информации, закодированной в нуклеотидной последовательности.

ДНК является носителем генетической информации. Участок ДНК, несущий информацию об одной полипептидной цепи называется геном. Каждая молекула ДНК содержит множество разных генов, кодирующих синтез определенного белка. При делении “копии” ДНК расходятся по двум дочерним клеткам, каждая из которых вследствие этого будет иметь одну и ту же информацию, которая находится в “материнской” клетке, а значит и одинаковые наборы генов. Но непосредственного участия в синтезе белков ДНК не принимает. Она содержится в хромосомах ядра и отделена ядерной мембраной. К рибосомам посылается несущий информацию посредник – информационная РНК. Как это про-

исходит? Для этого служат два других типа матричных биосинтезов – транскрипция и трансляция.

Биосинтез РНК (транскрипция)

Синтез и-РНК происходит в присутствии ДНК, выполняющей роль матрицы (матрицей служит одна из цепей ДНК). Синтез РНК происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Все синтезированные молекулы и-РНК имеют структуру, комплементарную матрице (т.е. одной из цепей ДНК). Транскрипция катализируется ферментом РНК-полимеразой. Фермент присоединяется к матрице не в любом ее месте, а в специальных участках, называемых *промоторами*: в этих местах молекулы ДНК есть последовательности нуклеотидов, узнаваемые РНК-полимеразой. Связывание РНК-полимеразы с промотором приводит к локальному расхождению нуклеотидных цепей в этом участке; одна из цепей служит матрицей. Нарастивание молекулы РНК происходит в результате перемещения РНК-полимеразы вдоль ДНК путем присоединения очередного рибонуклеотида, комплементарного тому дезоксирибонуклеотиду ДНК, который в данный момент находится в области активного центра РНК-полимеразы. В участке ДНК, где заканчивается ген, имеется последовательность нуклеотидов (терминирующий кодон), достигнув которого РНК-полимераза и синтезированная РНК отделяются от ДНК. Таким образом получают отдельные молекулы РНК, каждая из которой содержит информацию одного гена или группы генов (называемой *опероном*), несущих информацию о структуре белка, необходимого для выполнения одной функции.

Биосинтез белка (трансляция)

Биосинтез белков отличается от других типов матричных синтезов двумя принципиальными особенностями:

1) нет соответствия между числом мономеров в матрице и продукте реакции (в и-РНК 4 разных нуклеотида, а в белке 20 разных аминокислот);

2) структура рибонуклеотидов (мономеров матрицы) и аминокислот (мономеров продукта) такова, что избирательные взаимодействия между ними, подобные образованию пар А–Т, С–G невозможны, иначе говоря, между и-РНК (матрицей) и пептидной цепью белка (продуктом) нет комплементарности.

Из этого следует, что механизм использования матрицы при синтезе белков должен быть иным, чем в случае синтеза ДНК и РНК. Если репликацию и транскрипцию можно сравнить просто с переписыванием

текста, то трансляция – это дешифровка, декодирование информации об аминокислотной последовательности, закодированной с помощью нуклеотидной последовательности. Способ шифровки в нуклеиновых кислотах информации о первичной структуре белков получил название *биологического кода* (его называют также генетическим, нуклеотидным, аминокислотным кодом).

Биологический код – система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов в и-РНК.

Один из первых вопросов, который возникает при выяснении структуры биологического кода – это вопрос о *кодовом числе*, т.е. о числе нуклеотидных остатков, кодирующих включение в белок одной аминокислоты. Очевидно, что кодовое число не может быть равным 1, т.к. в этом случае с помощью четырех нуклеотидов можно было закодировать только четыре аминокислоты. При кодовом числе 2 количество разных нуклеотидных пар будет равно числу перестановки из четырех элементов по 2, т.е. равно $4^2=16$, что также недостаточно для кодирования всех аминокислот. Число разных троек нуклеотидов равно $4^3=64$. Это в три с лишним раза превышает минимальное число, необходимое для кодирования 20 аминокислот. Экспериментально доказано, что в биологическом коде кодовое число равно трем: тройку нуклеотидных остатков (триплет), кодирующих включение одной аминокислоты, называют *кодоном*.

Из 64 триплетов 61 используется для кодирования аминокислот, а три – UAA, UAG и UGA – обозначают конец матрицы: на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи – *терминирующие триплеты*. Каждый триплет кодирует только какую-нибудь одну аминокислоту. Это свойство кода называют *специфичностью* или *однозначностью*. С другой стороны, одна аминокислота может кодироваться двумя или большим числом (до шести) разных триплетов, т.е. код вырожден.

Путь информации от ДНК к белку представляется следующим образом:

ДНК	G-A-A A-C-T C-G-G A-T-G ..	нетранскибируемая цепь
	⋮ ⋮ ⋮ ⋮ ⋮	
	C-T-T T-G-A G-C-C T-A-C ..	- кодоны ДНК
и-РНК	G-A-A A-C-U C-G-G A-U-G ..	- кодоны и-РНК
Белок	Glu- Thr- Arg- Met- ..	аминокислотная последовательность

К настоящему времени биологический код изучен у большого количества разных организмов – от вирусов и бактерий до высших животных. Во всех случаях он оказался одинаковым. Эта универсальность кода лишней раз свидетельствует о единстве происхождения всех форм жизни на Земле.

Ошибка в биологическом коде приводит к различным болезням. Например, у здоровых людей в гене, несущем информацию о β -цепи гемоглобина, триплет GAA или GAG, стоящий на шестом месте, кодирует глутаминовую кислоту. У больных гемофилией второй нуклеотид в этом триплете заменен на U, а GUA или GUG кодирует аминокислоту валин.

Изменение структуры ДНК, передающееся последующим поколениям, называется мутацией. На молекулярном уровне мутация – это изменение нуклеотидной последовательности ДНК. В какой-то степени, мутация – это спонтанный процесс, которому ДНК подвергается постоянно. Причины мутаций различны:

1). связана с возможностью существования нуклеотидных оснований в двух таутомерных формах; предполагают, что в случае один на миллион возможно образование пар оснований и с таутомером;

2). действие продуктов нормального метаболизма клетки (пероксиды, азотистая кислота) – являются мутагенами, т.е. веществами, способными индуцировать химические мутации ДНК;

3). радиация. ДНК интенсивно поглощает УФ-излучение и при достаточной дозе это излучение убивает большинство клеток, а остальные подвергаются очень глубокой мутации (водородные связи заменяются на ковалентные). Однако каждая клетка имеет механизм для восстановления ДНК – с помощью ферментов она заменяет поврежденный фрагмент.

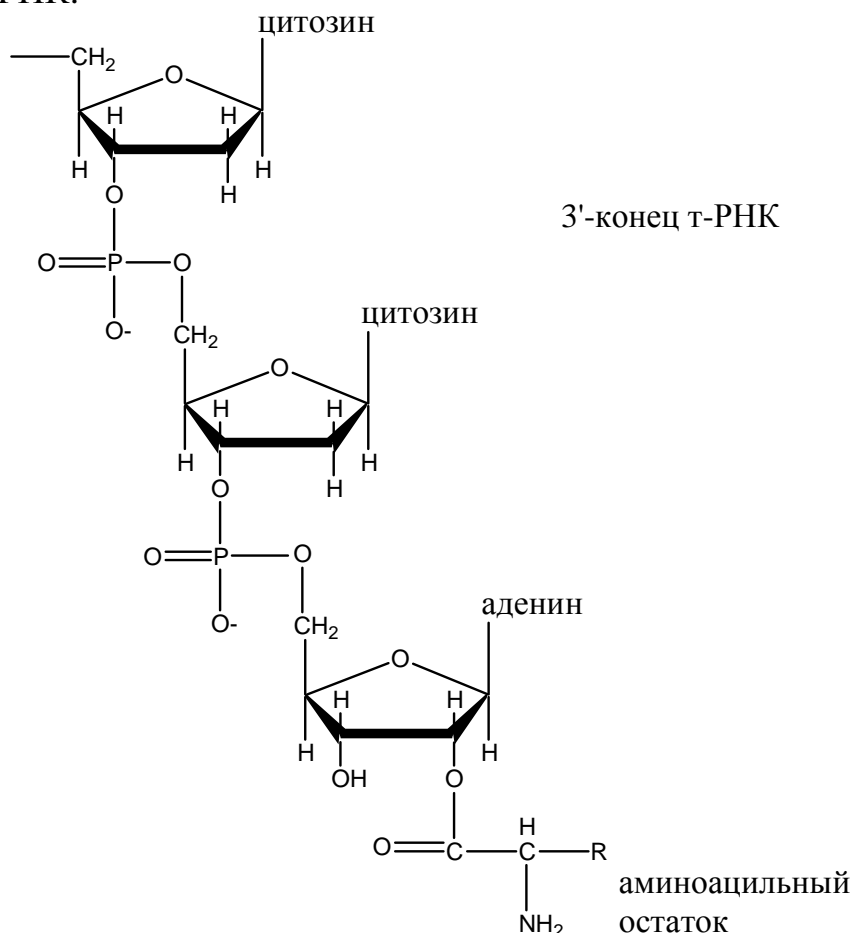
Мутации изменяют генетический материал клетки: возникают либо болезни, либо прекращается выработка какого-либо белка, либо просто активность белка уменьшится.

Адапторная функция т-РНК

Между аминокислотами и нуклеотидами (или триплетами нуклеотидов) невозможны комплементарные взаимодействия по типу образования нуклеотидных пар A...T, C...G, A...U. поэтому было сделано предположение о существовании молекул-адапторов, каждая из которых может взаимодействовать с определенным кодоном, с одной стороны, и с определенной аминокислотой, с другой стороны. В 1957 году эти молекулы были обнаружены – ими оказались транспортные РНК (т-РНК). Очевидно, что для адаптирования 20 разных аминокислот к соответ-

ствующим им кодонам нужно 20 разных т-РНК. Эти т-РНК обозначают следующим образом: т-РНК^{Ala} т-РНК^{His} и т.д. (аланиновая т-РНК, гистидиновая т-РНК и т.д.). Однако, поскольку код вырожден, число разных т-РНК больше 20 (не меньше числа кодонов, имеющих смысл, т.е. не меньше 61).

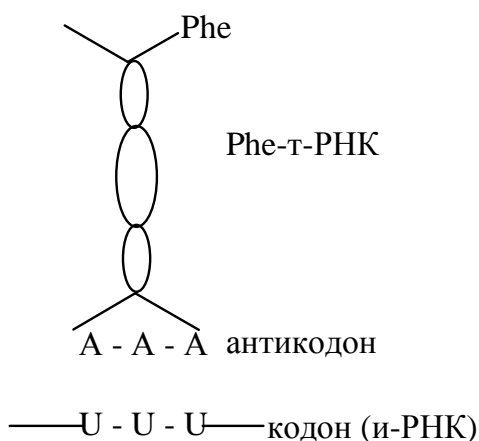
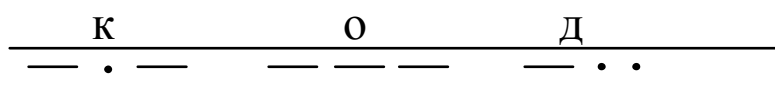
Взаимодействие т-РНК с аминокислотами – ферментативный процесс, приводящий к образованию ковалентной связи между аминокислотой и т-РНК, катализируются эти реакции аминоацил-т-РНК-синтетазами. Такие соединения называют аминоацил-т-РНК (аа-т-РНК). Аминокислота присоединяется к 3'-концу нуклеотидной цепи т-РНК (где имеется последовательность А – С – С, общая для всех т-РНК), при этом образуется сложноэфирная связь за счет карбоксильной группы аминокислоты и гидроксильной группы концевого остатка адениловой кислоты в т-РНК:



Существует не менее 20 разных аминоацил-т-РНК: каждый из этих ферментов катализирует реакцию только одной из 20 аминокислот с т-РНК, соответствующей этой аминокислоте. Например, аланил-т-РНК-синтетаза катализирует реакцию аланина с аланиновой т-РНК:



Т.о., аминоацил-т-РНК-синтетазы должны иметь в активном центре участок, комплементарный одной из аминокислот, и участок, комплементарный какой-то части молекулы одной из т-РНК. Именно вследствие такой субстратной специфичности каждая из аминоацил-т-РНК-синтетаза “узнает” и “выбирает” из смеси 20 аминокислот и нескольких десятков т-РНК определенную пару – аминокислоту и соответствующую ей т-РНК, и соединяет эту пару. Взаимодействие аа-т-РНК с кодоном и-РНК обеспечивается тем, что в одной из петель молекулы т-РНК имеется триплет нуклеотидов, комплементарный какому-нибудь кодону. Такой триплет называют *антикодоном*. Образование аа-т-РНК можно сравнить с изготовлением двойного шрифта, например, для перевода знаков азбуки Морзе в знаки буквенного алфавита:



Роль матричной РНК

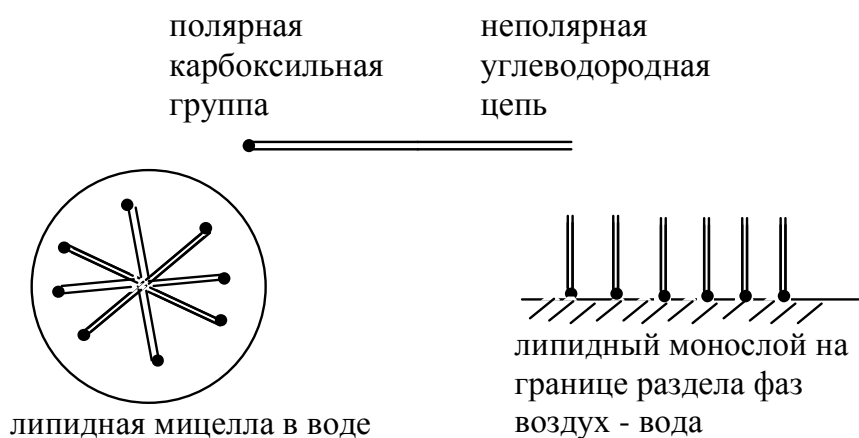
Располагая двойным шрифтом, легко прочитать текст, записанный азбукой Морзе. Достаточно расставить шрифт на телеграфной ленте соответственно знакам азбуки Морзе. Роль и-РНК в трансляции аналогична роли телеграфной ленты в этом примере: аа-т-РНК присоединяется антикодонами к соответствующим кодонам и-РНК, в результате чего аминокислотные остатки оказываются расположенными в той последовательности, в какой расположены кодоны в и-РНК. Теперь остается лишь соединить аминокислотные остатки пептидной связью, чтобы получилась пептидная цепь (белок) с определенной первичной структурой. Таким образом, последовательность кодонов и-РНК *коллинеарна* последовательности аминокислотных остатков в соответствующем белке.

Эта схема отражает лишь принципиальный механизм перевода нуклеотидной последовательности (точнее, последовательности кодонов) в аминокислотную последовательность.



Раздел 6. ЛИПИДЫ

Липиды (от греческого *lipos* – жир) – это общее название для всех известных жиров и жироподобных веществ. Они не растворимы в воде и растворимы в неполярных растворителях (эфир, бензол, гексан и т.д.) В каждой клетке животного или растительного организма содержится определенное количество липидов, выполняющих жизненно важные функции: они являются основными структурными компонентами клеточных мембран, играют защитную роль, служат формой, в виде которой запасается и транспортируется энергетическое топливо. К липидам относят и ряд веществ, которые присутствуют в небольшом количестве и обладают биологической активностью – стероидные гормоны, простагландины, жирорастворимые витамины. Липиды также входят в состав более сложных соединений, например, липопротеинов и липосахаридов, которые опять-таки располагаются в основном в биологических мембранах клеток и во внешних оболочках некоторых вирусов. Особенностью всех липидов является наличие в молекуле полярной и неполярной частей (гидрофильной и гидрофобной):



Липиды делят на омыляемые и неомыляемые в зависимости от способности к гидролизу с образованием в щелочной среде солей высших карбоновых кислот.

Омыляемые липиды

Омыляемые липиды – это сложные эфиры спиртов (высших одноатомных, глицерина или аминок спирта) и высших карбоновых кислот и фосфорной кислоты. Омыляемые липиды делят на простые и сложные.

Простые омыляемые липиды гидролизуются до спирта и карбоновых кислот. При гидролизе сложных липидов кроме спирта и карбоновых кислот получается еще и другое вещество, например, фосфорная кислота или углевод. В состав всех липидов входят высшие карбоновые кислоты, насыщенные и ненасыщенные. Из насыщенных высших жирных кислот в организме чаще других встречаются:

Пальмитиновая – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ Т.пл. 61°C

Стеариновая – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ Т.пл. 69°C

Лигноцериновая – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$ Т.пл. 83°C

Из ненасыщенных высших кислот чаще всего встречаются:

Олеиновая – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-CH=CH-(CH}_2)_7\text{-COOH}$ Т.пл. 14°C

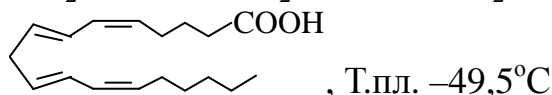
Линолевая – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH(CH}_2)_7\text{-COOH}$ Т.пл. -5°C

Линоленовая –

$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-(CH}_2)_7\text{-COOH}$ Т.пл. -11°C

Арахидоновая –

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH(CH}_2)_3\text{-COOH}$



подавляющее большинство жирных кислот в организме имеет четное число углеродных атомов. Источниками жирных кислот в организме являются липиды пищи (главным образом, жиры) и синтез жиров из углеводов.

Линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты содержат две и более двойных связей и не синтезируются в организме, поэтому их необходимо вводить в рацион как незаменимые компоненты пищи. Они содержатся в основном в растительных маслах, способствуют снижению уровня холестерина и предотвращают атеросклероз. Незаменимые жирные кислоты необходимы также для синтеза простагландинов – группы гормонов местного действия.

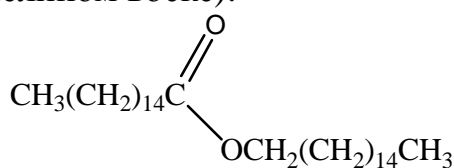
Расходятся жирные кислоты в основном по трем направлениям: 1) они включаются в состав резервных жиров; 2) включаются в состав сложных липидов; 3) окисляются до углекислого газа и воды с выделением энергии.

Простые липиды

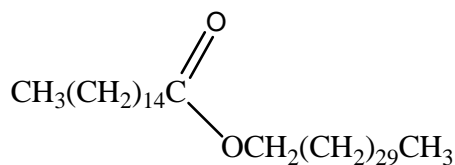
К простым липидам относятся воски, жиры и масла.

Воски – это сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов. Они образуют защитную смазку на коже и предотвращают растения от высыхания. Например: цетилпальмитат

(получают из спермацетового масла) или мирицилпальмитат (содержится в пчелином воске):



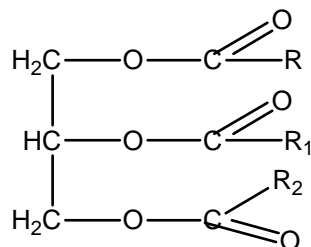
цетилпальмитат



мирицилпальмитат

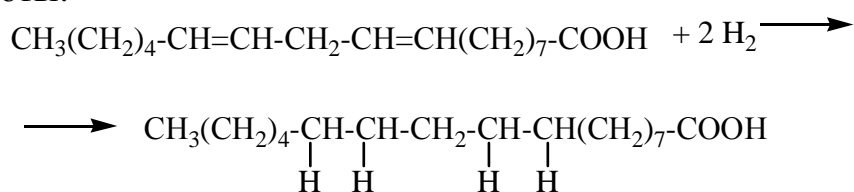
Эти эфиры являются нейтральной основой для приготовления различных мазей.

Жиры и масла – (нейтральные жиры, глицеролипиды, триацилглицериды) являются сложными эфирами глицерина и жирных кислот. Общая формула глицеридов



Жиры – твердые, масла – жидкие. Энергетическая ценность жиров и масел почти в 2 раза выше, чем у белков и углеводов.

В триацилглицеридах животного происхождения содержатся, главным образом, насыщенные жирные кислоты, которые являются твердыми веществами, а в растительных – ненасыщенные кислоты, которые при комнатной температуре имеют жидкую консистенцию. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты, имея в своем составе одну или несколько двойных связей, являются более реакционноспособными, чем насыщенные. Они легко присоединяют различные атомы по месту двойных связей, например, водород, превращаясь при этом в насыщенные кислоты:

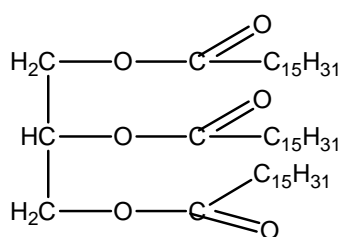


Этот процесс называется гидрогенизацией. Вещества, подвергнутые гидрогенизации, меняют свои свойства. Так, если растительные масла подвергнуть гидрогенизации, то они превратятся в твердые жиры.

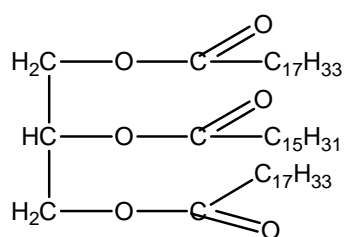
При гидролизе жиры распадаются на глицерин и свободные жирные кислоты. Чем дольше протекает гидролиз, тем большее число молекул жира распадается, тем больше появляется свободных жирных кислот. Следовательно, определение количества свободных жирных кислот характеризует степень гидролиза жира. С этой целью введен показатель – кислотное число, при котором определяется уровень свободных жирных кислот. Оно выражается количеством КОН (в мг), пошедшего на нейтрализацию 1 г жира.

В живом организме гидролиз жиров происходит под действием фермента липазы.

В зависимости от состава жирных кислот, жиры могут быть простыми, когда в их состав входят 3 одинаковые жирные кислоты, и смешанными – при наличии в молекуле жира разных кислот, например:



трипальмитин



смешанный жир

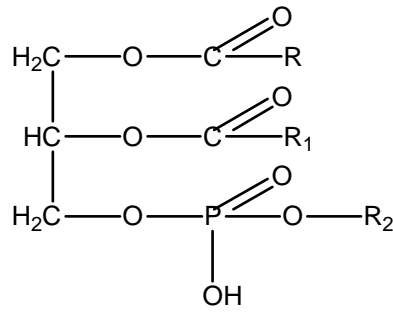
Сложные липиды

В отличие от простых липидов, используемых в качестве энергетического материала, сложные липиды выполняют пластические функции и используются, главным образом, как структурные компоненты биологических мембран. Все сложные липиды содержат остаток жирных кислот. Спиртовая часть может быть представлена глицерином, сфингозином или инозитом.

Основные группы соединений, которые относят к сложным липидам следующие:

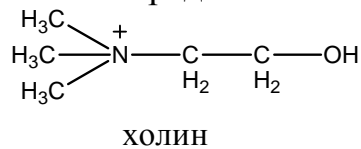
1. Фосфолипиды

а) глицерофосфолипиды, фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины), фосфатидилсерин и др. – состоят из глицерина, двух молекул жирных кислот, одна из которых насыщенная, а другая ненасыщенная, фосфорной кислоты и азотистого основания. Общая их формула следующая:



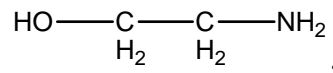
где R – насыщенная кислота, R₁ – ненасыщенная кислота, R₂ – азотистое основание

Если азотистое основание представлено холином

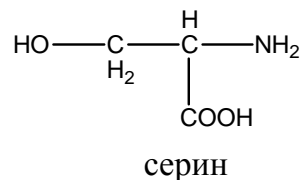


то в этом случае фосфолипид называется фосфатидилхолином.

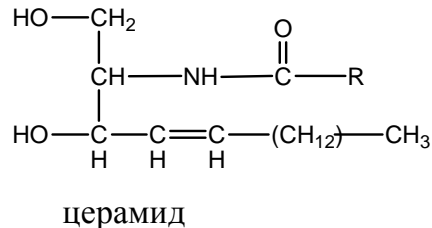
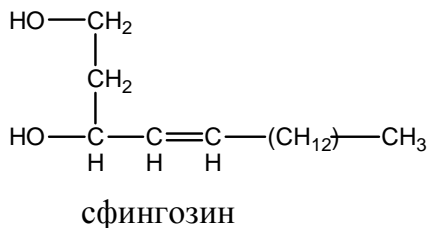
Если в состав фосфолипида входит этаноламин



то он называется фосфатидилэтаноломином или кефалином; если фосфолипид имеет в своем составе аминокислоту серин, то он называется фосфатидилсерином.



б) сфинголипиды (сфингомиелины) – фосфолипиды, в которых вместо глицерина находится ненасыщенный аминспирт – сфингозин. Сфингофосфолипиды являются производными церамидов -N-ацильных производных сфингозина.

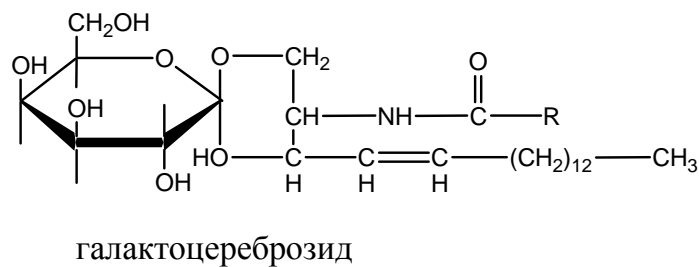


R - углеводородный радикал жирной кислоты, которая связана с аминогруппой сфингозина амидной связью

Церамиды – это группа соединений, различающихся по остатку жирной кислоты. В сфинголипидах водород гидроксильной группы у первого углеродного атома замещен на фосфохолин, фосфоэтаноламин или фосфосерин. Например:



2. Гликолипиды включают углеводный остаток (чаще всего D-глюкозу или D-галактозу), который ковалентно связан с липидным остатком. Чаще всего встречаются углеводные производные церамида (N-ацилсфингозина). Общее название таких гликолипидов – гликосфинголипиды, гликозилцерамиды (или цереброзиды).



Гликолипиды содержатся, в основном, в нервных тканях и мембранах.

Неомыляемые липиды

Неомыляемая липидная фракция содержит вещества трех основных типов: терпены, стероиды, простагландины и тромбоксаны.

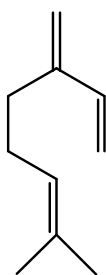
Терпены

Терпены – это эфирные масла некоторых растений. Отличаются приятным запахом. Для терпенов характерно число атомов углерода, кратное пяти: 5, 10, 15 и т.д. Хотя большая часть терпенов – ненасыщенные углеводороды, к этой группе соединений относятся также соответствующие спирты, кетоны, карбоновые кислоты и даже пероксиды. В 1920 г. Ружичка сформулировал “изопреновое правило”. Это правило, суммировавшее все предшествующие исследования по установлению строения терпенов, гласит, что *терпены образуются в результате полимеризации изопрена по типу “голова к хвосту”*, т.е. терпены можно рассматривать как полимеры изопрена. Типы известных терпенов приведены в табл. 6.1.

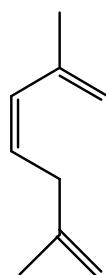
Таблица 6.1. Классификация терпенов

Тип	Число изопреновых звеньев	Число атомов углерода
монотерпен	2	10
сесквитерпен	3	15
дитерпен	4	20
тритерпен	6	30
тетратерпен	8	40

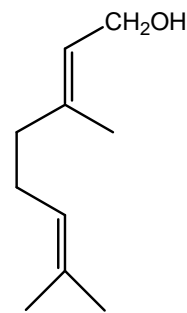
1. Монотерпены



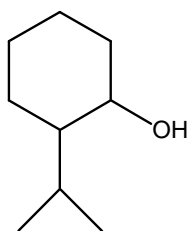
мирцен
(лавр)



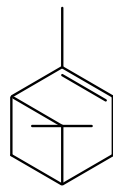
оцимен
(базилик)



гераниол
(роза)



ментол
(перечная мята)

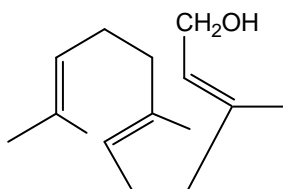


α -пинен
(скипидар)

Можжевельник = содержит пинен и оцимен, ромашка = монотерпены

Указанные растительные источники не являются единственными. Терпены встречаются в нескольких растениях, а гераниол, к примеру, практически в каждом растении.

2. Сесквитерпены



фарнезол

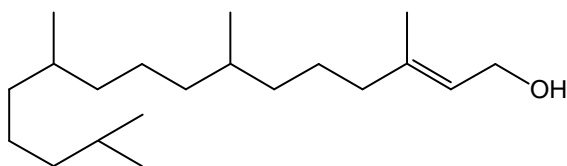
Магнолия – сесквитерпены и монотерпены (цитраль), азалия – сесквитерпены

Сирень – фарнезол

Валериана - валеренол

Фарнезол – душистый компонент ландыша, представляет собой ациклический терпеновый спирт.

3. Дитерпены



фитол

Фитол – продукт щелочного гидролиза хлорофилла, в настоящее время применяется в качестве предшественника в промышленном синтезе витаминов К и Е.

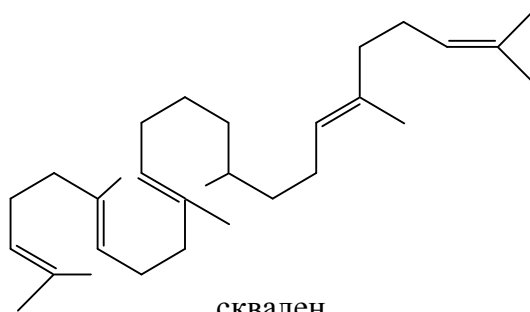
Жасмин - фитол

Предполагается, что витамин Е, токоферол, каким-то образом может влиять на процесс старения. Значение его для организма пока не выяснено до конца.

Витамин К (К₁, К₂, К₅ и К₇) – играет важную роль в процессах свертывания крови.

4. Тритерпены

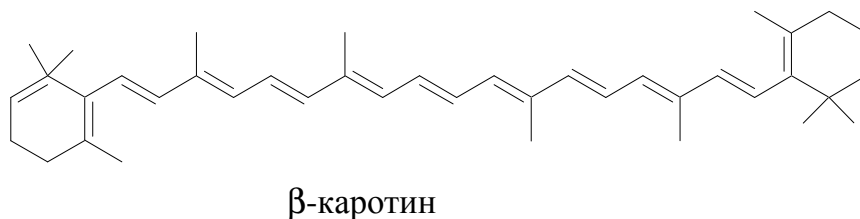
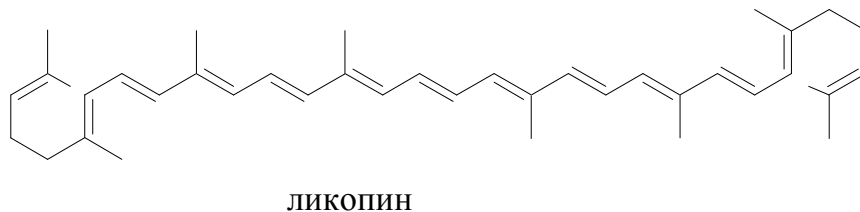
Сквален С₃₀Н₅₀ – наиболее важный тритерпен. Он содержится в дрожжах, оливковом масле и составляет 40% (по массе) жира печени акулы. Несмотря на ограниченную коммерческую значимость, сквален является основным тритерпеном и биологическим предшественником стероидов.



Амарант – семена содержат 8 – 10 % сквалена

5. Тетратерпены

Тетратерпены широко распространены в природе. Благодаря большому числу сопряженных двойных связей они часто входят в состав растительных пигментов:

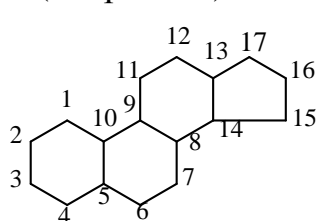


Обычно ликопин выделяют из томатной пасты с помощью хроматографии на колонке. β-каротин содержится в моркови. Он является предшественником витамина А.

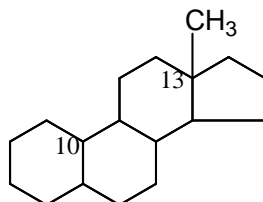
Стероиды

В настоящее время известно около 20 тысяч стероидов, из них более ста используется в медицине.

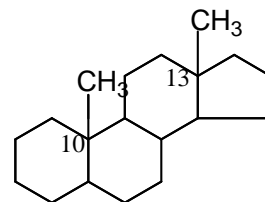
Стероиды можно рассматривать как производные тетрациклического насыщенного углеводорода циклопентанпергидрофенантрена (стерона), метилированного в положение 13 (эстран) или в положениях 10 и 13 (андростан):



циклопентанпергидро-
фенантрен



эстран

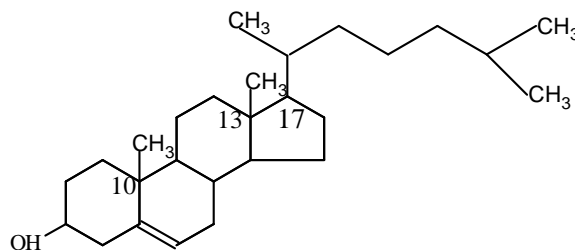


андростан

Многие стероиды содержат боковую цепь в положении 17. По строению этой боковой цепи, а также по различиям функций стероиды образуют четыре группы:

1. Стерины – имеющие восьмиуглеродную боковую цепь. К стеринам относятся холестерин и фитостерины.

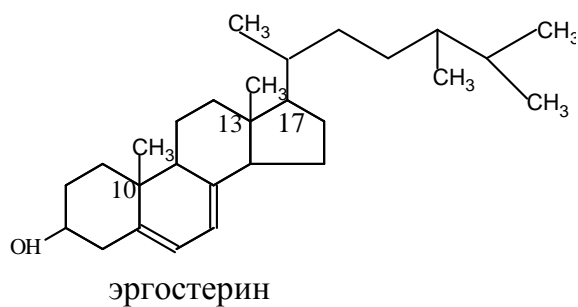
Холестерин обнаруживается почти во всех органах и тканях животных организмов. Из холестерина в организме синтезируются стероидные гормоны:



холестерин

Другие стерины, встречающиеся в природе, отличаются от холестерина или по длине боковой цепи или по степени ненасыщенности.

Эргостерин – является провитамином витамина D:

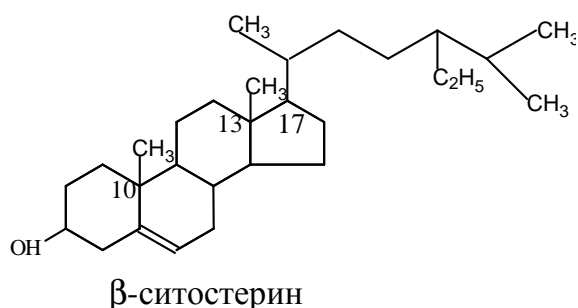


Особенно велико содержание эргостерина у дрожжевых микроорганизмов, особенно в пекарских дрожжах.

Стигмастерин – содержится в большом количестве в сахарном тростнике и соевом масле:

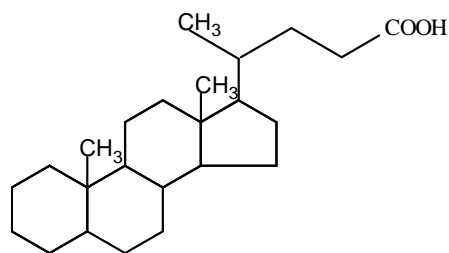


β -ситостерин. Источником получения β -ситостерина является сахарный тростник и хлопковое масло:



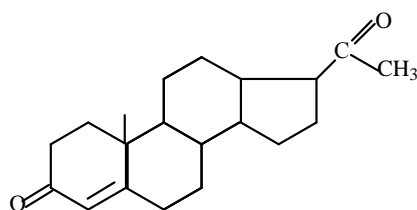
Ситостерин и стигмастерин – наиболее перспективные исходные продукты для получения стероидных гормонов.

2. Желчные кислоты, у которых боковая группа содержит пятиуглеродную цепь. В печени часть холестерина превращается в желчные кислоты. Их можно рассматривать как производные холановой кислоты:



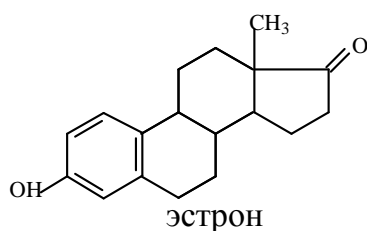
холановая кислота

3. Кортикостероиды и прогестерон с двухуглеродной боковой цепью:

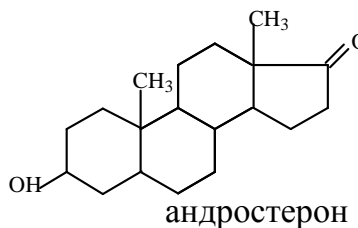


прогестерон

4. Женские и мужские половые гормоны (эстрогены и андрогены), у которых боковой цепи в положении 17 нет совсем:



эстрон

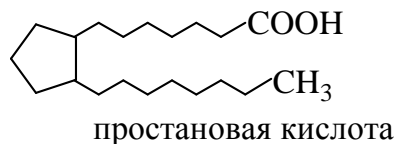


андростерон

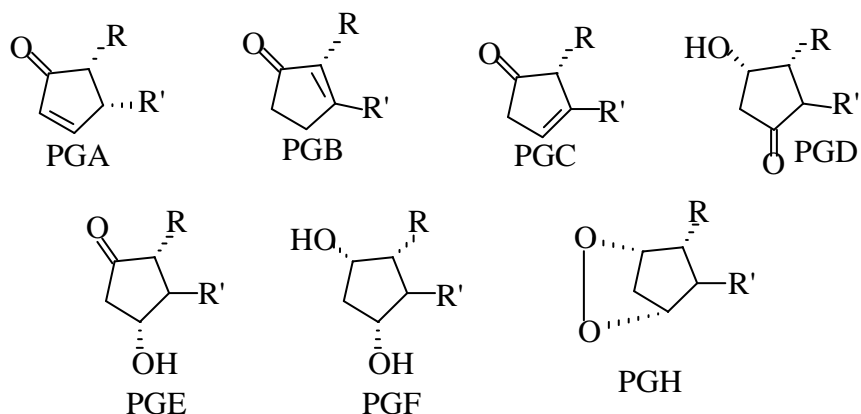
Простагландины и тромбоксаны

Простагландины и тромбоксаны были обнаружены в тридцатых годах прошлого столетия. Структура первого простагландина установлена в 1962 году. Все простагландины и тромбоксаны обладают чрезвычайно высокой биологической активностью. В организме они синтезируются из полиненасыщенных жирных кислот, главным образом из арахидоновой кислоты. Простагландины и тромбоксаны выполняют функции местных гормонов.

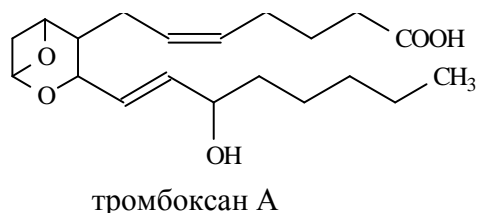
В составе простагландинов содержится пятичленный углеродный цикл, и, следовательно, их можно рассматривать как производные пропановой кислоты:



В зависимости от природы и положения заместителей в кольце их обозначают буквами А, В, С, D, Е, F и H. Стабильные природные простагландины относятся к группам Е и F:

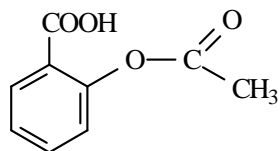


Тромбоксаны содержат шестичленный гетероцикл:



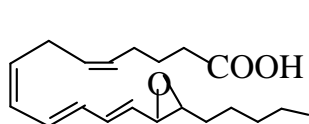
Простагландины и тромбоксаны обнаружены во многих организмах и тканях. Описано множество физиологических и фармакологических проявлений их действия на различные клетки, например, простагландины семейства Е вызывают расслабление гладких мышц бронхов и трахеи, а простагландины группы F – их сокращение. Простагландины и их синтетические аналоги применяются в качестве лекарственных средств в акушерской практике для стимуляции родовой деятельности, при астме для снятия спазма бронхов, для предупреждения и лечения тромбозов, снижения артериального давления.

Простагландины участвуют в воспалительном процессе: их концентрация в очаге воспаления повышена, и они усиливают воспалительную реакцию. Аспирин (ацетилсалициловая кислота) инактивирует фермент, катализирующий первые две реакции превращения арахидоновой кислоты в простагландин – этим и объясняется противовоспалительное действие аспирина.

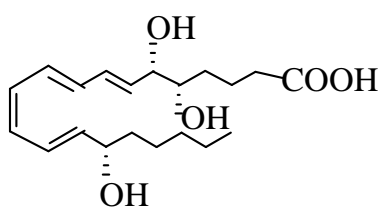


аспирин

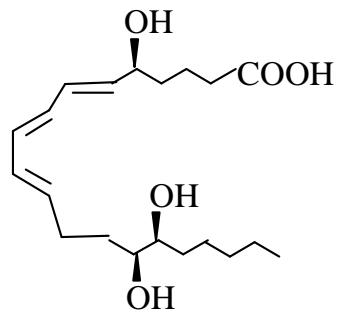
Некоторые синтетические аналоги простагландинов и тромбоксанов представлены ниже:



липотриен А



липоксин А



липоксин В

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки в 3-х томах. – М.: Мир, 1994. – т. 1, – 492 с.
2. Николаев А.Я. Биологическая химия. – М.: Высшая школа, 1989. – 495 с.
3. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии в 2-х томах. – М.: Мир, 1989. – т. 1. – 692 с.
4. Ермолаев М.В. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1974. – 264 с.
5. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая химия. – М.: Мир, 1974. – 1132 с.
6. Терней А. Современная органическая химия в 2-х томах. – М.: Мир, 1981. – т.1. – 678 с. – т.2. – 651 с.

Лариса Владимировна Тимощенко

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Учебное пособие

Научный редактор
доктор химических наук, профессор Филимонов В.Д.

Редактор Т.А.Климова

Подписано к печати 30.10.2003.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная
Печать RISO. Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 5,05.
Тираж 100 экз. Заказ . Цена С.31.
Издательство ТПУ. 634050, Томск, пр. Ленина, 30.